Warszawa, 20.01.2023 r.

Dr hab. Kamil Brzóska, prof. IChTJ
Zakład Naukowy – Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa
e-mail: k.brzoska@ichtj.waw.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Płódowskiej pt. „Czynniki modulujące odpowiedź komórkową wywołaną promieniowaniem jonizującym"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Płódowskiej została wykonana pod kierunkiem dr hab. Haliny Lisowskiej, prof. UJK w Zakładzie Biologii Medycznej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy dwóch aspektów odpowiedzi komórkowej na promieniowanie jonizujące. Pierwszy z nich to zmiany promieniowrażliwości komórek wywołane czynnikami zewnętrznymi takimi jak np. temperatura. Konieczność dokładniejszego zbadania tego aspektu uzasadnia fakt, że często w ramach badań mechanizmów naprawy DNA z wykorzystaniem promieniowania jonizującego jako czynnika indukującego uszkodzenia, komórki są napromieniane na lodzie aby zatrzymać naprawę DNA podczas procesu napromieniania a następnie aktywować ją poprzez przeniesienie komórek do temperatury 37°C. Przyjmuje się przy tym, że jedynym efektem obniżonej temperatury jest odwracalne zahamowanie naprawy DNA. Założenie to niekoniecznie jest prawdziwe, na co wskazują wyniki badań pokazujące radioprotekcyjne działanie hipotermii na poziomie uszkodzeń cytogenetycznych. Należy więc domniemywać, że hipotermia nie tylko hamuje naprawę DNA lecz również moduluje odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA w niezbadany dotąd sposób. Drugi aspekt odpowiedzi komórkowej na promieniowanie poruszany w recenzowanej pracy to biologiczne efekty działania niskich dawek promieniowania przy niskiej mocy dawki. Wpływ ekspozycji na niskie dawki promieniowania jonizującego na zdrowie człowieka jest przedmiotem

niesłabnącego zainteresowania badaczy zajmujących się radiobiologią i ochroną radiologiczną. Jest to zagadnienie niezwykle istotne m.in. z punktu widzenia pacjentów poddawanych procedurom medycznym wykorzystującym promieniowanie jonizujące jak również personelu medycznego wykonującego te procedury oraz pracowników przemysłu jądrowego. Czynnikiem utrudniającym prowadzenie badań dotyczących działania niskich dawek jest często brak odpowiednich źródeł promieniowania i związanych z nimi układów badawczych umożliwiających prowadzenie hodowli komórkowych w warunkach chronicznego narażenia na promieniowanie jonizujące o niskiej mocy dawki. Celem recenzowanej pracy było z jednej strony zbadanie wpływu hipotermii na kinetykę naprawy uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem oraz na poziom stresu oksydacyjnego, a z drugiej strony zbadanie odpowiedzi komórki na niskie dawki promieniowania ze szczególnym uwzględnieniem roli kinazy ATM w procesie adaptacji komórek do niskich dawek promieniowania. Oba opisane powyżej aspekty odpowiedzi komórkowej na promieniowanie i związane z nimi cele pracy są bardzo ważnymi i aktualnymi zagadnieniami badawczymi, wobec czego wybór przez Doktorantkę opisanej powyżej tematyki badań uważam za bardzo interesujący i w pełni uzasadniony.

Przedstawiona do oceny rozprawa przygotowana jest w sposób klasyczny i składa się ze spisu treści, wykazu skrótów, wstępu zakończonego wyszczególnieniem celów pracy, rozdziału o materiałach i metodach, opisu wyników oraz ich dyskusji zakończonej wnioskami. Na końcu pracy znajduje bibliografia. Dołączone streszczenie w języku polskim i angielskim dobrze oddaje charakter prac i nie budzi zastrzeżeń.

Radiobiologia jest ze swej natury dziedziną interdyscyplinarną, usytuowaną na styku fizyki, biologii i chemii. Z tego powodu, wstęp do pracy radiobiologicznej skierowanej do szerszego grona odbiorców niż tylko osoby zajmujące się na co dzień tego typu zagadnieniami, powinien wprowadzać czytelnika w przedmiot pracy zaczynając od omówienia podstawowych zjawisk fizycznych, biologicznych oraz chemicznych związanych z oddziaływaniem promieniowania jonizującego na materię ożywioną. Tak też postępuje Doktorantka w swojej rozprawie, wprowadzając czytelnika w tematykę pracy począwszy od opisu mechanizmów powstawania uszkodzeń DNA pod wpływem promieniowania w sposób pośredni i bezpośredni, poprzez omówienie mechanizmów naprawy DNA, aż do wyszczególnienia czynników wpływających na promieniowrażliwość komórek. Przedstawienie tych zagadnień w sposób zwięzły i przystępny nie jest zadaniem trywialnym. Doktorantka wywiązała się z tego zadania

KB

poprawnie, choć nie ustrzegła się pewnych niejasności i niezręcznych sformułowań np. pisząc na str. 7, że „Utrata elektronu powoduje jonizację takiej cząsteczki, atomu lub ośrodka, przez który przechodzi" lub, że „Wolny rodnik natomiast zawiera niesparowany elektron, dlatego jest zarówno jonem, jak i wolnym rodnikiem". Na str. 24 Doktorantka przywołuje publikacje Bekker-Jensen i wsp. oraz Lukas i wsp. w których wykorzystywano komórki U2OS ze stabilną ekspresją białek NBS1 i 53BP1 znakowanych GFP w celu zbadania na które etapy odpowiedzi na uszkodzenia DNA wpływa hipotermia. Doktorantka nie opisuje jednak w żaden sposób wyników tych prac co jest zaskakujące, gdyż jak się wydaje, mogą być one istotne w kontekście prowadzonych przez Doktorantkę badań. Szczególnie niejasną częścią wstępu jest podrozdział 1.7 dotyczący wewnątrz- i międzykomórkowej odpowiedzi na uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem. Przede wszystkim brak jasnej definicji zmienności wewnątrzkomórkowej i międzykomórkowej. Ostatnie zdanie podrozdziału 1.7 sugeruje, że zmienność międzykomórkowa jest związana z czynnikami środowiskowymi ale zważywszy na fakt, że mówimy o hodowli *in vitro*, w której analizowane komórki są hodowane na tej samej szalce, trudno mówić o istotnych różnicach w czynnikach środowiskowych oddziałujących na poszczególne komórki.

Rzucającym się w oczy niedostatkiem wstępu recenzowanej pracy (a także w mniejszym stopniu innych jej części) jest zbyt oszczędne stosowanie przez Doktorantkę odnośników literaturowych. Przykładowo na str. 21 Doktorantka stwierdza, że „Jednym z obserwowanych efektów jest obniżenie efektu letalnego przez obniżenie mocy promieniowania. Jednak niejednokrotnie obserwuje się efekt odwrotny, gdzie wyższa moc dawki równa się niższa przeżywalność jednak także niższa częstość mutacji". Aż prosi się aby dodać w tym miejscu odnośniki literaturowe do publikacji opisujących wymienione efekty. Ogółem bibliografia pracy obejmuje 64 pozycje, co jest wynikiem dość skromnym. Częstsze stosowanie odnośników pozytywnie wpłynęłoby na odbiór pracy przez czytelnika oraz pozwoliłoby Doktorantce w pełniejszym stopniu wykazać swoją znajomość literatury przedmiotu (zwłaszcza najnowszej), którą bez wątpienia posiada.

Cele pracy wymienione na str. 29 są w większości sformułowane jasno i poprawnie z wyjątkiem celu trzeciego, który brzmi: „Wpływ hipotermii na poziom stresu oksydacyjnego wywołanego niską temperaturą". Sformułowanie to jest niejasne i wymaga doprecyzowania.

W rozdziale „Materiały i Metody" mgr Płódowska wyczerpująco opisała stosowane przez siebie techniki badawcze, co ułatwiło późniejsze śledzenie otrzymanych wyników. Jedyne czego mi brakuje w opisie materiałów i metod to krótkie uzasadnienie wyboru linii komórkowej U2OS do przeprowadzenia badań. Istotną zaletą recenzowanej pracy jest wykorzystanie, opisanego szczegółowo w tym rozdziale, źródła euksenitowego o niskiej aktywności, umożliwiającego prowadzenie hodowli komórkowych w warunkach niskiej dawki promieniowania. Jest to bardzo cenny układ badawczy, którego wykorzystanie istotnie podnosi wartość recenzowanej pracy.

Dokumentacja otrzymanych wyników zajmuje około 50 stron. Część z wyników została już opublikowana w prestiżowych czasopismach „International Journal of Radiation Biology" oraz „Scientific Reports". Autorka szczegółowo przedstawia wyniki swoich badań poczynając od wpływu hipotermii na mechanizm odpowiedzi na uszkodzenia DNA, poprzez ocenę wrażliwości komórek na uszkodzenia DNA aż do roli kinazy ATM w procesie adaptacji na niskie dawki promieniowania. Lektura tej części dysertacji uzmysławia ogrom pracy jaki został włożony przez autorkę w przeprowadzenie opisanych eksperymentów. Wyniki są przedstawione w większości jasno i klarownie z wykorzystaniem licznych tabel i wykresów. Dość rzadko spotykanym podejściem w analizie statystycznej prac z zakresu biologii jest stosowanie testów wielkości efektu, takich jak stosowany w recenzowanej pracy test d Cohena. Jego wykorzystanie oczywiście wzbogaca pracę, ale nie jest on stosowany konsekwentnie we wszystkich przeprowadzonych analizach. Brakuje wyjaśnienia co decydowało o tym czy w danej analizie test ten został wykorzystany czy też nie. Opis wyników byłby również bardziej przejrzysty gdyby Doktorantka wyjaśniała w jaki sposób sąsiednie części (podrozdziały) wiążą się ze sobą i jaki ciąg logiczny tworzą. Przykładowo po rozdziałach 4.1.1 i 4.1.2 opisujących kinetykę tworzenia i zanikania ognisk naprawczych po ekspozycji na promieniowanie w różnych temperaturach, następuje rozdział o analizie stresu oksydacyjnego, bez wyjaśnienia dlaczego tego typu analiza została wykonana i jak wiąże się z analizami opisanymi chwilę wcześniej. Wprawdzie odpowiedź na tego typu pytania znajdujemy w kolejnym rozdziale pracy czyli w dyskusji, ale krótkie wyjaśnienie związków pomiędzy poszczególnymi etapami pracy już na etapie opisu wyników ułatwiłoby czytelnikowi lekturę. Podobnie ułatwiłoby lekturę zaznaczenie we wszystkich tabelach i wykresach, w jednolity sposób, różnic istotnych statystycznie. Autorka zaznacza na wykresach istotne różnice bądź za pomocą gwiazdek (np. rycina 33, 34), bądź umieszczonych na wykresie wartości p (np. rycina 27, 28). Zdarza się też, że Doktorantka pozostawia czytelnika w

niepewności co do tego czy obserwowana różnica jest istotna statystycznie, choć z lektury głównego tekstu można się domyślać, że jest (rycina 45).

Dyskusja i wnioski zawarte są w 13-stronnicowym omówieniu, w którym Doktorantka w sposób dojrzały interpretuje własne wyniki i odnosi je do badań innych autorów. Niemniej, kilka stwierdzeń zawartych w tej części pracy budzi wątpliwości. Na str. 112 Doktorantka stwierdza, iż „Uzyskany wynik sugeruje, że czynniki środowiskowe obecne podczas hodowli komórkowej *in vitro* wpływają na wrażliwość komórek na promieniowanie w teście ognisk naprawczych 53BP1". Doktorantka przypisuje zmienność w częstości ognisk 53BP1 między komórkami czynnikom środowiskowym, jednak nie wyjaśnia jakie mogą być różnice w czynnikach środowiskowych działających na poszczególne komórki na tej samej szalce w hodowli *in vitro*. Na str. 116, interpretując uzyskane wyniki, Doktorantka stwierdza, iż „Uzyskane wyniki pokazały, że dawka adaptacyjna, przy równoczesnej inhibicji ATM, powoduje włączenie alternatywnego sensora, który jest w stanie rozpoznawać nienaprawione uszkodzenia DNA". Doktorantka przyznaje, że na podstawie uzyskanych wyników nie jest w stanie odpowiedzieć na pytanie o naturę tego alternatywnego sensora ale moim zdaniem mogłaby pokusić się w ramach dyskusji o wysunięcie jakiejś hipotezy na ten temat. Czy takim sensorem mogłoby być jakieś ze znanych białek uczestniczących w procesach naprawy DNA, czy też należy podejrzewać, że mamy tu do czynienia z zupełnie nowym nieznanym jeszcze mechanizmem? Warto byłoby również przedyskutować możliwość, że mechanizm działania hipotermii jest związany ze zmianami konformacji chromatyny oraz działaniem mechanizmów epigenetycznych. Z pewnością wyniki pracy doktorskiej mgr. Magdaleny Płódowskiej mogą być bardzo dobrym punktem wyjścia do badań w tym kierunku.

Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr Magdaleny Płódowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego wzbogacające naszą wiedzę o mechanizmach odpowiedzi komórkowej na promieniowanie jonizujące. Autorka wykazała się wnikliwością badawczą, umiejętnym wykorzystaniem szerokiego spektrum technik eksperymentalnych oraz umiejętnością interpretacji wyników. Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Mimo przedstawionych uwag krytycznych, rozprawa spełnia

wszystkie warunki określone w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję o dopuszczenie mgr Magdaleny Płódowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

20.01.2023, Kamil Brzóska

Dr hab. Kamil Brzóska, prof. IChTJ