

Poznań, dn. 09. stycznia 2023 r.

dr hab. Wiktoria M. Suchorska
Wielkopolskie Centrum Onkologii
im. M. Skłodowskiej-Curie w Poznaniu
wiktoria.suchorska@wco.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł:

Czynniki modulujące odpowiedź komórkową wywołaną promieniowaniem jonizującym

Autor: mgr Magdalena Płodowska

Promotor: dr hab. Halina Lisowska, prof. UJK

Narażenie człowieka na promieniowanie jonizujące (ang. *ionising radiation*, IR) stale rośnie ze względu na jego wykorzystanie w różnych dziedzinach. Ekspozycja na IR jest szkodliwa, jednak ryzyko zdrowotne związane z promieniowaniem zmniejsza się przy niższych dawkach. Zgodnie z VII raportem *Biological Effects of Ionizing Radiation* (BEIR) dawki od 0 do 100 mGy są uważane za tzw. niskie dawki promieniowania (ang. *low dose ionising radiation*, LDIR). Do niedawna uważano, że niskie dawki IR również powodują długoterminowe zagrożenia dla zdrowia. Jednak badania epidemiologiczne, kliniczne i przedkliniczne podkreślają korzystne skutki zdrowotne LDIR. Zjawisko to: indukcji korzystnych efektów wraz z początkiem łagodnego stresu po narażeniu na działanie małej dawki czynnika/ów szkodliwych,

nazywa się hormezą. Wstępne potraktowanie niższymi dawkami czynnika szkodliwego może być swoistym kondycjonowaniem przed negatywnymi skutkami późniejszego narażenia na wysokie dawki. Badania te często są uważane za kontrowersyjne, jednak wobec coraz większej liczby podobnych doniesień nie sposób ich ignorować.

Rosnące wykorzystanie metod diagnostycznych i terapeutycznych opartych na IR związane jest się ze wzrostem liczby chorób przewlekłych wśród pacjentów i pracowników służby zdrowia. Jednak wiele czynników, takich jak dawka promieniowania, moc dawki i czas trwania ekspozycji, wpływa na chroniczne skutki wywołane działaniem promieniowania jonizującego. Potencjalny związek między promieniowaniem jonizującym o niskiej dawce a zagrożeniami dla zdrowia jest kontrowersyjny ze względu na niedostępność bezpośrednich badań na ludziach. Badania dotyczące efektów działania tzw. niskich dawek promieniowania jonizującego mają znaczenie dla zdrowia publicznego, ponieważ narażenie na niskie dawki tła jest powszechne. Oczekuje się, że dane z raportów epidemiologicznych i klinicznych oraz wyniki badań przedklinicznych mogą rozwiązać te kontrowersje i pomóc w wyjaśnieniu pojęcia zagrożeń zdrowotnych związanych z działaniem niskich dawek promieniowania. Dane dostępne w literaturze są często rozbieżne, co budzi szereg dyskusji.

Zawartość rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma układ typowy: na 130 stronach zawarto 6 rozdziałów oraz wykaz skrótów, streszczenie i piśmiennictwo.

We Wstępie doktorantka na blisko 20 stronach opisuje wpływ promieniowania jonizującego na organizmy żywe, szczególnie skupiając się czynnikach warunkujących odpowiedź komórek na działanie promieniowania jonizującego.

Doktorantka szczegółowo charakteryzuje popromienne uszkodzenia DNA i mechanizmy ich naprawy, a następnie przedstawia czynniki wpływające na reakcję komórki na promieniowanie jonizujące uwzględniając zarówno czynniki fizyczne, takie jak dawka, rodzaj, energia promieniowania, frakcjonowanie dawki, moc dawki i temperatura, jak i czynniki chemiczne (głównie poziom utleniania), a także różnice w promieniowrażliwości tkanek. W dalszej części Wstępu doktorantka

przechodzi do omówienia wpływu hipotermii na mechanizm odpowiedzi na uszkodzenia DNA oraz roli sygnalizacji ATM w tymże mechanizmie w procesie adaptacji na niskie dawki promieniowania jonizującego

Dalej autorka przedstawia Cele pracy. W kolejnym rozdziale scharakteryzowano wykorzystaną Metodę. Następnie na blisko 50 stronach doktorantka opisuje uzyskane w trakcie realizacji badań Wyniki. Dyskusja jest zawarta na 10 stronach, a Wnioski przedstawiono w sposób opisowy. Praca zawiera w sumie 46 rycin i 29 tabel. W Piśmiennictwie umieszczono 64 pozycje, z których większość jest starsza niż 10 lat.

Wartość naukowa rozprawy

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania dotyczą czynników modulujących odpowiedź komórkową wywołaną promieniowaniem jonizującym ze szczególnym uwzględnieniem wpływu niskich dawek promieniowania jonizującego. Jak wspomniałam powyżej, tematyka podjęta przez Doktorantkę jest niezwykle istotna ze względu na coraz bardziej powszechne narażenie pacjentów i personelu na działanie niskich dawek promieniowania jonizującego. W przedstawionej do recenzji rozprawie Doktorantka analizowała wpływ temperatury, dawek adaptacyjnych o niskich mocach oraz zróżnicowania wewnątrz- i międzykomórkowego jako czynników modulujących odpowiedź komórkową na promieniowanie jonizujące. Materiał oraz dobór metod do przeprowadzenia badania nie budzi większych zastrzeżeń. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością technik wykorzystywanych w badaniach radiobiologicznych. W ramach zrealizowanego projektu mgr Piódowska analizowała kinetykę naprawy DNA, poziom reaktywnych form tlenu oraz badała progresję cyklu komórkowego. Ponadto Doktorantka wykonała szereg testów klonogennych i testów mikrojądrowych w zmiennych warunkach modulujących odpowiedź badanych komórek na działanie promieniowania jonizującego. Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą dobrze dobranych testów. Wyniki zostały przedstawione w sposób prawidłowy i wyczerpująco opisane. Dyskusja jest dobrze poprowadzona i prowadzi do uprawnionych Wniosków.

W pracy Doktorantka wykazała, że zastosowanie hipotermii wzbudza powstawanie ognisk naprawczych γ H2AX, a w szczególności NBS1 oraz 53BP1,

a efekt uwrażliwiający hipotermii jest ograniczony do późnej fazy G₂ cyklu komórkowego, jednak bez istotnego oddziaływania na przeżywalność badanych komórek. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów Doktorantka stwierdziła także wpływ czynników środowiskowych obecnych w hodowli komórkowej *in vitro* na radiowrażliwość komórek. W opinii recenzenta niezwykle interesującym wnioskiem uzyskanym przez Doktorantkę jest wykazanie aktywacji systemów naprawczych w badanej linii U2OS po działaniu dawek adaptacyjnych, nawet jeżeli działanie takich dawek indukuje jedynie niewielką odpowiedź adaptacyjną. Autorka podjęła też próbę wyjaśnienia tego mechanizmu, a uzyskane wyniki mogą stanowić solidną podstawę do dalszych badań odpowiedzi adaptacyjnej, a w szczególności mechanizmu jej działania.

Uwagi krytyczne

Pomimo interesujących wyników przeprowadzonych badań wskazujących na znaczenie działania dawek adaptacyjnych doktorantka nie ustrzegła się kilku nieścisłości.

Przede wszystkim w mojej opinii, jako recenzenta, zabrakło sformułowania celu ogólnego pracy. Jednoznaczne doprecyzowanie takiego celu bardzo istotnie ułatwiłoby śledzenie toku rozumowania doktorantki, co w świetle uwag redakcyjnych zamieszczonych poniżej nie było łatwe. Mam też wrażenie, że brak takiego celu mógł wpłynąć na nieco nieuporządkowany Wstęp do pracy. Nie do końca rozumiem zamysł Doktorantki umieszczania opisu wpływu temperatury na odpowiedź komórki na działanie promieniowania jonizującego w dwóch miejscach. W podrozdziale 3.1 Materiał biologiczny w opisie metody modyfikacji komórek linii U2OS Doktorantka powołuje się na dwie publikacje, z których druga (Lukas J i wsp., *Nature Cell Biology* 2011) jest publikacją przeglądową i nie ma w niej opisu metodyki. Zabrakło także, moim zdaniem, podania źródła pochodzenia komórek. Dalej w opisie Warunków napromieniania nie podano, co stanowi kontrolę eksperymentów, a jedynie, że były one „odpowiednie” (choć trzeba przyznać, że w Wynikach autorka już odwołuje się do kontroli). Uważam, że określenie „odpowiednia konfluencja” powinno zostać doprecyzowane. Zabrakło wyjaśnienia, na jakiej podstawie Doktorantka założyła, że komórki otrzymywały niejednorodną dawkę promieniowania podczas napromieniania

źródłem euksenitowym o niskiej aktywności. Doktorantka nie podaje także stężeń przeciwiał stosowanych w barwieniach umożliwiających analizę kinetyki naprawy DNA. Ponadto, chociaż większość eksperymentów przedstawiono na schematach, co jest niewątpliwie zaletą, niektóre nie były do końca czytelne. Uważam także, że Wnioski lepiej byłoby zaprezentować w punktach odpowiadających celom.

Uwagi redakcyjne

Niestety, praca została zredagowana bardzo niestarannie, co oczywiście nie obniża jej dobrej oceny merytorycznej, ale w bardzo znaczący sposób utrudniło jej czytanie.

Najpoważniejszym zarzutem redakcyjnym są liczne błędy typograficzne, głównie błędy edycyjne. W zasadzie w wersji, która otrzymałam do recenzji występują na niemal co drugiej stronie. Uważam, że na tym poziomie rozwoju naukowego istotna jest także umiejętność redagowania tekstu i taka niechlujność jest niedopuszczalna. Praca zawiera liczne interesujące ryciny, ale są one „porozrzucane”, podzielone pomiędzy stronami. Należy także zaznaczyć, że zgodnie z regułą podpisy powinny znajdować się nad, a nie pod Tabelami.

Wnioski końcowe

Najnowsze doniesienia w literaturze wskazują na zmniejszone ryzyko zachorowania na raka, liczbę zgonów związanych z rakiem, ograniczenie upośledzeń neurologicznych, poprawę funkcji nerwowych i zmniejszenie powikłań związanych z cukrzycą po ekspozycji na LDIR. Ponadto stwierdzono, że niskie dawki promieniowania jonizującego mogą wpływać na zmianę zachowanych ewolucyjnie szlaki odpowiedzi na stres. Jednak obraz molekularnych szlaków sygnałowych w odpowiedziach LDIR jest niejasny. Poza tym informacje na temat biomarkerów epidemiologicznej ekspozycji na LDIR są mocno ograniczone. Znajomość mechanizmów odpowiedzi LDIR, a także mechanizmu działania dawek adaptacyjnych może pomóc w opracowaniu metod terapeutycznych opartych na LDIR w celu zatrzymania rozwoju choroby. Modulacja tych szlaków może być pomocna w rozwijaniu odporności na promieniowanie wśród ludzi. Jednak w tym celu

konieczne jest zebranie większej liczby dowodów klinicznych z dodatkowymi danymi biochemicznymi, komórkowymi i molekularnymi oraz szeroko pojęte badania skutków ubocznych działania niskich dawek promieniowania jonizującego, także długoterminowych, a wyniki pracy doktorskiej mgr Magdaleny Płodowskiej dobrze wpisują się w te potrzeby.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Magdaleny Płodowskiej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) obowiązującej aktualnie w Polsce.

Stawiam wniosek o dopuszczenie ww. rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wiktoria Suchorska

Dr hab. n. med. Wiktoria M. Suchorska
Naczelnik Pracowni Radiobiologii
Miejskiego Centrum Onkologii



Poznań, dn. 13. stycznia 2023 r.