

Dr hab. n. med. Dorota Słonina, prof. NIO
Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów
Narodowy Instytut Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie
PIB, Oddział w Gliwicach
dorota.slonina@io.gliwice.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Płodowskiej
pt. „Czynniki modulujące odpowiedź komórkową wywołaną
promieniowaniem jonizującym”**

1. Wartość naukowa rozprawy - trafność podjętej tematyki badawczej i jej oryginalność

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska porusza wciąż aktualny, ważny i praktyczny problem dla badań radiobiologicznych, mianowicie wpływ różnych czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych na popromienną odpowiedź układów biologicznych.

Badania radiobiologiczne od zawsze miały i nadal mają szczególne znaczenie dla radioterapii. Dzięki nim wciąż poznajemy mechanizmy decydujące o odpowiedzi nowotworu i tkanek prawidłowych na leczenie promieniowaniem. Mają też swój udział w ochronie radiologicznej np. w szacowaniu biologicznych skutków działania niskich dawek promieniowania, z którymi mamy do czynienia w warunkach narażenia zawodowego, medycznego lub środowiskowego. Problemem badań radiobiologicznych jest brak standaryzacji, zwłaszcza warunków napromieniania (stosowane są różne rodzaje i energie promieniowania, odmienne moce dawek i to często bez dokładnej dozymetrii, oraz różne temperatury). W efekcie trudno jest uzyskać powtarzalność efektów radiobiologicznych *in vitro* lub *in vivo* przez różne laboratoria. Doktorantka w pierwszej części swojej pracy postanowiła skupić się na ocenie wpływu temperatury (szczególnie niskiej 0,8°C) podczas i po napromienianiu komórek na mechanizm indukcji i naprawy uszkodzeń DNA. W dalszej części pracy, wykorzystując specjalnie skonstruowane, euksenitowe źródło promieniowania jonizującego, zbadała mechanizmy odpowiedzi komórkowej na niskie dawki promieniowania jonizującego o bardzo niskich mocach dawek. Następnie zajęła się mechanizmem odpowiedzi adaptacyjnej w tym rolę

kinazy ATM. Odpowiedź adaptacyjna (obok niestabilności genetycznej, efektu widza, czy zjawiska nadwrażliwość na niskie dawki promieniowania jonizującego) jest jednym ze zjawisk biologicznych występujących po niskich dawkach promieniowania, których nie da się opisać modelem liniowym. Fakt ten oraz nie do końca poznane mechanizmy tych zjawisk przyczyniają się między innymi do trudności z ustaleniem ryzyka nowotworów popromiennych po małych dawkach promieniowania, lub uniemożliwiają wykorzystanie tych zjawisk w praktyce klinicznej. Zatem zaproponowane tematy badań dobrze wpisują się w kierunki badań radiobiologicznych z odniesieniem zarówno do radioterapii jak i ochrony radiologicznej. Za oryginalną i bardzo interesującą uważam część pracy, w której Doktorantka bada różnice w promieniowrażliwości wewnątrz i międzykomórkowej wykorzystując w tym celu komórki jedno i dwujądrowe oraz mikrojądra. Jestem pod wrażeniem ilości zastosowanych przez doktorantkę metod badawczych i ogromu wykonanej pracy.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

W części wstępnej rozprawy Doktorantka umiejętnie wprowadza czytelnika w dziedzinę badawczą. Dokładnie omawia, poparte licznymi ilustracjami, biologiczne efekty działania promieniowania jonizującego na poziomie komórkowym i molekularnym, w tym popromienne uszkodzenia DNA i mechanizmy naprawy tych uszkodzeń. Następnie omawia czynniki decydujące o odpowiedzi komórek na promieniowanie takie jak rodzaj i energia promieniowania, wielkość i moc dawki, efekt tlenowy oraz wewnątrzkomórkowa promieniowrażliwość. W dalszej części Doktorantka skupia się na zagadnieniach ściśle związanych z tematyką pracy doktorskiej, a więc z wpływem niskiej temperatury podczas napromieniania komórek na mechanizm odpowiedzi na popromienne uszkodzenia DNA, wpływem czynników środowiskowych na promieniowrażliwość jąder w komórkach jedno i dwujądrowych oraz na zjawisku odpowiedzi adaptacyjnej i roli kinazy ATM. Wstępna część pracy napisana jest spójnie i czyta się ją bardzo dobrze. Cele szczegółowe pracy zostały sformułowane precyzyjnie i konsekwentnie zrealizowane o czym świadczy zawartość dalszej części pracy. Metodyka badań, została właściwie dobrana do realizacji zamierzonych celów i opisana szczegółowo i zrozumiale. Doktorantka podeszła do tematu bardzo kompleksowo stosując wiele różnych metod badawczych takich jak test klonogeny, testy ognisk γ H2AX, NBS1 i 53BP1, test mikrojądrowy, a także rozkład komórek w fazach cyklu komórkowego. Przy tak dużej ilości przeprowadzonych eksperymentów z wieloma punktami czasowymi świetnym

pomysłem było przedstawienie metodyki każdego eksperymentu w postaci kolorowego schematu. To bardzo ułatwiło podążanie za celem kolejnych etapów pracy.

W rozdziale Wyniki Doktorantka, odwrotnie jak to jest w zwyczaju, w pierwszej kolejności przedstawiła wyniki w tabelach i na wykresach, a następnie omówiła ich znaczenie. W mojej opinii jest to dobry zabieg ponieważ pozwala czytelnikowi przeanalizować wyniki i samemu wyciągnąć wnioski, a dopiero później skonfrontować je z wnioskami autora. Wszystkie wyniki przedstawiono w sposób logiczny i udokumentowano starannie przygotowanymi tabelami, kolorowymi wykresami i obrazami.

W dyskusji Doktorantka konsekwentnie omówiła uzyskane wyniki i skonfrontowała je z raportami innych autorów. Badania nad wpływem niskiej temperatury 0,8°C wykazały, że umieszczenie komórek na topniejącym lodzie podczas ekspozycji na promieniowanie indukuje uszkodzenia DNA i wpływa na popromienną odpowiedź komórek (choć bez wpływu na przeżywalność komórek). Jest to bardzo praktyczny wniosek dla osób, które wykorzystują schładzanie komórek w celu zahamowania naprawy DNA. Z kolei badania nad mechanizmem adaptacji komórek na niskie dawki promieniowania jonizującego o niskich mocach dawek wykazały, że niskie dawki adaptacyjne aktywują systemy naprawcze, a w warunkach zablokowania kinazy ATM mogą indukować alternatywną drogę rozpoznawania uszkodzeń DNA. W badaniach, w których oceniano odpowiedź adaptacyjną poprzez podanie dodatkowej dawki 1 Gy (4 godz. po podaniu niskiej dawki) zaobserwowano słabą odpowiedź adaptacyjną. Powyższe eksperymenty wykazały przydatność euksenitowego źródła promieniowania do badań mechanizmów odpowiedzi adaptacyjnej w warunkach zbliżonych do naturalnych. Doktorantka poprowadziła dyskusję dojrzałe oraz przedstawiła perspektywy dalszych badań. Szkoda, że wnioski z przeprowadzonych badań nie zostały wypunktowane. Zamiast tego przyjęły formę podsumowania. Omówione wnioski odpowiadają jednak na założenia i cele pracy oraz ukazują uzyskane wyniki, które są oryginalnym osiągnięciem badawczym Doktorantki.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska ma formę monografii liczącej 128 stron i zawiera wszystkie wymagane elementy typowe dla oryginalnych prac badawczych. Szata graficzna jest bardzo atrakcyjna. Praca zawiera 46 kolorowych rycin i 29 tabel. Uwagę zwraca strona edytorska. Praca została przygotowana starannie, przejrzysto i poprawnie stylistycznie. Piśmiennictwo obejmuje 64

pozycje, z których połowa została opublikowana w latach 2010 – 2022. Piśmiennictwo stanowi przegląd aktualnej literatury dotyczącej omawianej tematyki. Oprócz trzech pozycji wszystkie prace opublikowano w języku angielskim. Nie mam zastrzeżeń do strony formalnej pracy.

4. Uwagi

Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniższe uwagi, które nie umniejszają wartości pracy i nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę.

1. We wstępie, w pkt. 1.5.1.3. Moc dawki, Autorka prawdopodobnie przez nieuwagę napisała, że „*Radioterapia typu FLASH polega na podawaniu promieniowania o ultrawysokiej dawce, o kilka rzędów wielkości wyższej niż stosowana w konwencjonalnej radioterapii klinicznej*”. Jest to nieprawdziwe stwierdzenie. Zdanie to powinno brzmieć „*Radioterapia typu FLASH polega na podawaniu promieniowania o ultrawysokiej mocy dawki, o kilka rzędów wielkości wyższej niż stosowana w konwencjonalnej radioterapii klinicznej*”. W radioterapii FLASH dawki całkowite są podobne jak w radioterapii konwencjonalnej, natomiast wysoka moc dawki >40 Gy/s sprawia, że czas napromieniania jest ok. 400-krotnie krótszy, trwa milisekundy. Pierwszy pacjent poddany tej terapii otrzymał dawkę 15 Gy w czasie 90 ms na raka skóry.
2. W rozdziale Materiał i metody, w pkt. 3.1. Materiał biologiczny, zabrakło mi informacji: Skąd pochodzi linia U2OS, czy została wyprowadzona w laboratorium Uniwersytetu, czy udostępniona?
Czy w komórkach tej linii występują mutacje? U młodych osób mięsaki kościopochodne mogą mieć podłoże genetyczne. Mutacja genu Rb (mając wpływ na cykl komórkowy) predysponuje do rozwoju siatkówczaka i mięsaka kościopochodnego.
Czy linia komórkowa nazwana U2OS- γ H2AX i U2OS to linia bez transfekcji? W opisie wspomniano tylko o liniach transfekowanych?
Czy znana jest promieniowrażliwość linii U2OS? W pracy nie pokazano krzywej przeżycia dla tej linii.
3. W rozdziale Materiał i metody, w pkt. 3.3.1. Warunki napromieniania w ŚCO w Kielcach. Nie jest jasne czy komórki były rzeczywiście napromieniane na lodzie, czy tylko transportowane na lodzie, a napromieniane na bolusie z parafiny o temp. pokojowej.
4. W komórkach napromienianych dawką 2 Gy, pierwszy punkt czasowy dla utrwalenia ognisk naprawczych to 0 min. Czy to oznacza, że komórki były utrwalane po podaniu

- dawki 2 Gy jeszcze w bunkrze? Kolejny punkt czasowy to 5 min, tyle czasu zwykle zajmuje dojście do laboratorium, jeżeli znajduje się w tym samym budynku co laboratorium.
5. W rozdziale Wyniki, we wszystkich tabelach (z dwoma wyjątkami) oraz w opisach do tych tabel zabrakło informacji co jest badanym parametrem. Dla przykładu w tabeli 5, 6, 7 brak informacji, że wartości w tabeli to liczba ognisk na jądro. W tabelach 15, 16 oraz 27 nie sprecyzowano że parametrem jest liczba MN na 1000 BNC. W mniejszych tabelach 15 i 16 w kolumnie t-test 37°C vs 0,8°C nie wiadomo, czy podane wartości to p. W opisie do Tabel 20 i 21 nie sprecyzowano jednostki powierzchni.
 6. W Tabelach od 5 do 7 i na rycinie 23 przedstawiono wyniki (liczbę ognisk dla schematów 37°C-37°C i 0,8°C-37°C) nie odejmując wartości kontrolnych 0 Gy. W publikacjach zwykle analizuje się wyniki pokazujące „czysty efekt dawki promieniowania”. Nie jest jasne dlaczego tylko w przypadku schematu 0,8°C-0,8°C przedstawiono wyniki z odjętymi wartościami kontrolnymi (Tabela 9 i ryc. 24).
 7. W Tabeli 6, która prezentuje liczbę ognisk γ H2AX w komórkach napromienionych dawką 2 Gy w różnych temperaturach, po odjęciu wartości kontrolnych 0 Gy zwraca uwagę mała liczba ognisk indukowanych dawką 2 Gy (maksymalnie ok. 17 ognisk po 10 min). W przeliczeniu na 1 Gy daje to od 8 do 9 ognisk na komórkę, co jest bardzo niską wartością w porównaniu do danych literaturowych. Zwykle 1 Gy indukuje od 20 do 40 ognisk γ H2AX/komórkę. Doktorantka nie komentuje tego wyniku w dyskusji. Może należałoby to połączyć z dużą promieniowrażliwością linii U2OS, dla której SF2 wyniosło 24-26% (wg Tabeli 14) i w związku z tym część uszkodzeń DNA mogła zostać nierozpoznana (wg *Teorii RIANs - Berthel E, Foray N and Ferlazzo ML. Cancers 2019;11:905-921*).
 8. Na rycinie 23, panel b, na której prezentowane są wyniki z Tabeli 6, wartości punktów (liczba ognisk γ H2AX na jądro) nie odpowiadają wartościom na skali czasowej. Podane wartości dla punktów czasowych 15, 30, 60, 120, 180 min i 24h są w rzeczywistości wartościami odpowiednio dla 5, 10, 15, 30, 60 i 120 min. W efekcie na wykresie brak jest danych dla 180 min i 24 godz. A zwłaszcza dane dla 24 godz. (widoczne w Tabeli 6) są intrygujące, ponieważ wynika z nich, że po 24 godz. naprawy, uszkodzeń jest dwukrotnie więcej (w przypadku obu temp. napromieniania) niż po krótszych czasach naprawy (120 i 180 min). Także wniosek podany w opisie wyników na stronie 58, że „*ekspozycja komórek w temp. 0,8 °C prowadziła do silniejszej indukcji ognisk γ H2AX, ale tylko w ciągu*

pierwszych 30 min naprawy” nie zgadza się z wynikami w Tabeli 6, z których wynika, że wniosek jest prawdziwy, ale w odniesieniu do pierwszych 10 min.

9. W opisie do Tabel 13 i 14 oraz 28 i 29 brak informacji jak obliczano wartości SF (np., że testy porównywano parami). Konieczne było dokonanie obliczeń, aby się zorientować.
10. W tabelach 15 i 16 zabrakło mi informacji nt odsetka komórek dwujądrowych widocznych po dawce 2 Gy (po różnych czasach utrwalania).
Doktorantka również w przypadku testu mikrojądrowego zdecydowała się nie odejmować wartości kontrolnej 0 Gy od wartości po dawce 2 Gy. Dla komórek U2OS-NBS1 wartość 0 Gy dla 37°C wynosiła 21,3, a dla 0,8°C wyniosła 30 (Tabela 15). Nieodjęcie tych wartości mogło zafałszować wynik przy porównaniu wartości uzyskanych po dawce 2 Gy.
11. W opisie Ryciny 44 nie wyjaśniono co przedstawia liniowy wykres ponad słupkami.
12. Z porównania frakcji przeżycia dla dawki 10,5 mGy przedstawionych na rycinach 45 i 46 wynika, że lepszą strategią przy ocenie przeżywalności komórek jest posiewanie komórek na szalki przed napromienianiem (SF=0,87), niż po napromienianiu (SF=0,5). Wynik ten sugeruje, że manipulacje komórkami po napromienianiu mogą zwiększać uszkodzenia. Na str. 105 podany wniosek jest prawdziwy zatem tylko dla dawki 5,9 mGy.
13. Znając krzywą przeżycia dla linii U2OS po ekspozycji na pojedyncze dawki promieniowania bardzo interesujące byłoby porównanie efektów działania niskich dawek 5,9 mGy i 10,5 mGy o bardzo niskiej mocy dawki do efektu dawki pojedynczej.
14. Dziwi mnie druk pracy doktorskiej jednostronnie. Nie jest to zgodne z zasadami zrównoważonego rozwoju, którymi powinniśmy się kierować.

5. Ocena końcowa

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Płodowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, a jej zawartość merytoryczna i staranny sposób przedstawienia wyników świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki. Rozprawa spełnia warunki stawiane pracom na stopień doktora określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie mgr Magdaleny Płodowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.