

prof. Janusz Braziewicz
Instytut Fizyki
Uniwersytet Jana Kochanowskiego
Uniwersytecka 7, 25-406 Kielce

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Moniki Alicji Mietelskiej

**„Wielkości nanodozymetryczne w analizie skutków napromieniania
komórek V79 lekkimi jonami”**

Rozprawa doktorska „*Wielkości nanodozymetryczne w analizie skutków napromieniania komórek V79 lekkimi jonami*” autorstwa mgr Moniki Alicji Mietelskiej została wykonana w Zakładzie Fizyki Biomedycznej Instytutu Fizyki Doświadczalnej na wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem dr hab. Beaty Brzozowskiej i dr. Marcina Pietrzaka. Treść rozprawy została zawarta na 100 stronach w 6 rozdziałach, które uzupełniają bibliografia, spisy tabel i rysunków, spis używanych skrótów i akronimów, tabela z wykorzystywanymi w pracy symbolami i ich jednostkami. Praca jest zakończona dwoma załącznikami zawierającymi wybrane dane nanodozymetryczne i biologiczne stanowiące istotne uzupełnienie treści rozprawy.

Oczywistym celem wszelkich badań radiobiologicznych jest poznawanie wpływu oddziaływania promieniowania jonizującego na komórki biologiczne, co jest niezwykle istotne w prowadzeniu terapii nowotworowych z wykorzystaniem promieniowania jonizującego oraz w aspekcie ochrony radiologicznej ludzi. Powstające uszkodzenia DNA są szczególną formą uszkodzeń, których stopień złożoności jest zależny od czynnika je wywołującego i w reakcji na nie komórki inicjują wieloetapowy proces odpowiedzi biologicznej.

Prowadzone przez Autorkę badania stanowiące podstawę recenzowanej rozprawy wynikają z zastrzeżeń ICRU (International Commission on Radiation Units & Measurements) dotyczących stosowania makroskopowych parametrów, takich jak liniowy przekaz energii czy względna skuteczność biologiczna jako parametrów jakości promieniowania. Szczególnie w przypadku terapii wysokoenergetycznymi jonami (takimi jak protony czy jony węgla) zastrzeżenia te wynikają ze sposobu oddziaływania hadronów z materią i faktu, że często podawany uśredniony liniowy przekaz energii nie może zastąpić faktycznego rozkładu tej wielkości. W rezultacie powstaje ryzyko przygotowania nieprecyzyjnego rozkładu dawki w napromienianej objętości, szczególnie w jego części dystalnej, niezależnie od wysiłków włożonych w walidację. Równoległym wyzwaniem jest kwestia wielkości stosowanych w ochronie radiologicznej w opisie skutków stochastycznych.

W odpowiedzi na zasygnalizowane wyżej zagadnienia, pani mgr Monika Mietelska w swojej rozprawie doktorskiej stoi na stanowisku, że rozpatrywanie skutków oddziaływania promieniowania jonizującego w materiale biologicznym w nanoskali powinno uwzględniać przestrzenną charakterystykę oddziaływania w obrębie podwójnej helisy DNA, której uszkodzenie może być dla komórki śmiertelne. Celem Jej pracy była weryfikacja możliwości zastosowania parametrów opisujących stochastyczne oddziaływania w nanoskali do określenia skuteczności lekkich jonów wykorzystywanych w procesie radioterapii.

W rezultacie przeprowadzonych badań Doktorantka koreluje nanodozymetryczne wielkości charakteryzujące strukturę toru cząstki jonizującej z biologicznym opisem odpowiedzi komórek dla linii komórkowej V79 fibroblastów płuc chomika chińskiego, która jest powszechnie używana w badaniach uszkodzeń DNA i procesów naprawczych.

Swoje wnioski opiera na nanodozymetrycznych wynikach eksperymentalnych otrzymanych przy pomocy specjalistycznego licznika gazowego Jet Counter pozwalającego na zliczanie jonów wytworzonych przez przejście pojedynczej cząstki pierwotnej w objętości czulej będącej modelem obiektu (targetu) biologicznego o rozmiarach porównywalnych z pojedynczym segmentem DNA. Zachodzące procesy oddziaływania Autorka odtwarza poprzez symulacje Monte Carlo i otrzymane parametry wykorzystuje do określenia wielkości nanodozymetrycznych w modelowanym fragmencie helisy DNA. Symulacje MC przeprowadziła wykorzystując możliwości systemu Geant4-DNA walidowane w oparciu o wyniki eksperymentalne z użyciem nanodozymetru Jet Counter. Po niezbędne dane przeżywalności napromienianych komórek otrzymane przez wiele grup badawczych na przestrzeni dekad pani mgr Monika Mielenska sięga do bazy PIDE (Particle Irradiation Data Ensemble).

Prowadzone przez Autorkę badania, to ważny temat współczesnej metrologii promieniowania jonizującego, którego zadaniem jest wprowadzenie wielkości fizycznych mających szansę precyzyjnie charakteryzować biologiczną skuteczność promieniowania w nanoskali zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym. Pani mgr Monika Mielenska równolegle do badań laboratoryjnych poszukuje rozwiązań niezbędnych do oceny tych wielkości w warunkach klinicznych, co wynika z faktu, że w terapii hadronowej stosowanie wielkości makroskopowych, takich jak dawka pochłonięta, liniowy przekaz energii czy względna skuteczność biologiczna charakteryzowana ilościowo i jakościowo w całej napromienianej objętości nie jest tożsame równomiernemu uszkodzeniu komórek nowotworowych na skutek stochastycznego charakteru oddziaływań wzdłuż toru cząstki jonizującej.

Treść rozprawy

Praca została podzielona przez autorkę na 6 niezależnych rozdziałów, a spis tematycznej literatury obejmujący 167 pozycji stanowi o erudycji pani mgr Moniki Mielenskiej i jest potwierdzeniem znajomości tematu. Całość pracy wzbogacona wieloma rysunkami oraz tabelami z wynikami badań została napisana w sposób bardzo przemyślany, językiem niezwykle hermetycznym, do którego nie można mieć jakichkolwiek zastrzeżeń.

W pierwszym rozdziale rozprawy „*Wstęp*” pani mgr Monika Mielenska przedstawiła tło, motywację oraz zakres prowadzonych badań, uzmysławiające czytelnikowi złożoność problemu. W rozdziale tym zdefiniowała jednoznacznie cel pracy i wynikające z tego zagadnienia do rozwiązania oraz omówiła układ pracy. Znajdujemy tutaj odsyłacze do 3 publikacji w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach naukowych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej oraz do jednej pracy będącej dopełnieniem omawianego zagadnienia.

W rozdziale drugim rozprawy „*Podłoże badań*” Doktorantka przedstawiła kompendium wiedzy na temat:

- teoretycznych podstaw związanych z fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi zagadnieniami oddziaływania promieniowania jonizującego z żywą materią biologiczną i różnych etapów oddziaływania promieniowania pierwotnego i wtórnego,

- stosowanych klinicznie wielkości służących ocenie ilości i jakości promieniowania jonizującego wykorzystywanego w radioterapii.

W zakresie czysto fizycznych aspektów zagadnienia przedstawiła krótki, lecz wystarczający, opis podstawowych typów oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego i korpuskularnego z materią oraz podstawowe wielkości fizyczne, dozymetryczne i radiobiologiczne niezbędne do kwantyfikacji rezultatów oddziaływania.

Na początku tego rozdziału Autorka wykazała, że w zakresach energii istotnych z punktu widzenia radioterapii i ochrony radiologicznej, masowa elektronowa zdolność hamowania ma charakter dominujący, ale naszkicowała również poziom istotności wkładu pochodzącego od radiacyjnej i jądrowej składowej tej wielkości.

W rozdziale tym Autorka przekonująco wiąże rozkład przestrzenny skutków fizycznych procesów oddziaływania cząstek z materią z przestrzennym rozkładem newralgicznych struktur biologicznych, wykazując tym samym potrzebę uwzględnienia stochastycznej natury oddziaływania promieniowania z materią. Precyzyjnie przedstawiła zestaw wielkości fizycznych w makro- i nano- skali niezbędnych do kwantyfikacji obserwowanych procesów zadanego systemu biologicznego. W tej części pracy pani mgr Monika Mielenska uzmysławia czytelnika, że obecnie oddziaływanie cząstek jonizujących w skali nanometrowej można badać eksperymentalnie za pomocą nanodozymetrów lub symulować z pomocą kodów MC. W celach symulacyjnych wybiera kod Geant4-DNA będący obecnie jedynym ogólnodostępnym zestawem narzędzi szerokiego przeznaczenia pozwalającym na symulację transportu promieniowania w zakresie niskich energii aż do progu jonizacji około 10 eV.

W drugiej części tego rozdziału znajdujemy opis struktury DNA i jej środowiska jakim jest komórka oraz szczegółowy opis kompleksowych uszkodzeń materiału biologicznego na poziomie DNA indukowanych promieniowaniem. Autorka przedstawiła tu również efekt wzmożenia tlenowego komórki i jego wpływ na odporność komórki na promieniowanie.

Autorka bardzo dokładnie opisuje modele radiobiologiczne stosowane do wyrażenia mechanizmów i skutków oddziaływania promieniowania jonizującego na żywą materię mierzonych w testach klonogennych, tj. model liniowo-kwadratowy i model molekularny, oraz wpływ różnych czynników (tj. faza cyklu komórkowego, powierzchnia jądra komórkowego) na otrzymywane wyniki eksperymentalne i parametry modeli je opisujące. Parametry modelu LQ wykorzystuje do wyznaczenia istotnych wielkości, tj. przekrój czynny na inaktywację czy wielkość RBE.

Na końcu rozdziału Doktorantka przedstawiła przegląd badań wskazujących na powiązanie między wielkościami nanodozymetrycznymi, a radiobiologicznymi.

Kolejny rozdział pracy zatytułowany „Dane nanodozymetryczne”, to kompendium wiedzy nt. metod i stosowanych narzędzi we współczesnych badaniach eksperymentalnych z zakresu radiobiologii. Autorka zasygnalizowała tutaj konieczność przeprowadzenia symulacji metodami Monte Carlo w celu oceny wielkości fizycznych, które są niemożliwe lub trudne do zmierzenia. Do walidacji używanych kodów MC wykorzystwała dane eksperymentalne uzyskane za pomocą nanodozymetru JC z NCBJ w ramach niezależnych prac badawczych. Niezbędne w tym celu pomiary wykonała na wiązkach protonów, cząstek alfa i jonów węgla.

Zasadnicza część tego rozdziału to opis symulacji, które posłużyły uzyskaniu danych nanodozymetrycznych wykorzystanych do zestawienia z parametrami radiobiologicznymi. Scharakteryzowano geometrię, uwzględnione procesy fizyczne i metody otrzymania danych dla jonu, dla którego niedostępne były przekroje czynne

W tym miejscu nasuwają się jednak pytania wynikające z niepełnej mojej wiedzy, tj’:

- W opisie tej procedury na stronie 50 znajdujemy jednak stwierdzenie, że „W nanodozymetrze JC cylindryczne objętości oddziaływania IV i czuła SV są tożsame, ...” co kłuci się z ich opisem na stronie 24 gdzie znajdujemy stwierdzenie, „Gdyby target był odizolowany, nie mógłby być prawidłową reprezentacją środowiska komórkowego, w którym poszczególne targety nie są od siebie odizolowane.” Ta sprzeczność wymaga chyba dokładniejszego wyjaśnienia.
- W opisie walidacji kodów MC pojawia się też pytanie na ile rozkład energetyczny padających jonów (82 MeV dla ^{12}C i 4.6 MeV dla alfa i 60 MeV dla protonów) został uwzględniony w symulacjach MC, a jeśli nie to jaki miałby wpływ na otrzymane wyniki. Problem mono- lub nie mono-energetyczności wiązek dotyczy nie tylko walidacji kodów MC w oparciu o wyniki eksperymentalne otrzymane przy pomocy JC, lecz również głównych wyników Pracy co znajdujemy w stwierdzeniu na stronie 54 „Wyniki symulacji pozwoliły na otrzymanie ICSD dla zadanych jonów i ich energii, co pozwoliło na obliczenie wielkości charakteryzujących ICSD (rozkład rozmiaru klastra jonizacyjnego), czyli M_1 , F_k i R_2 dla zadanych energii.”. Wydaje się, że zasadniczym jest więc pytanie, na ile badania przeprowadzone dla realnych wiązek o pewnym rozmyciu energetycznym porównywać z monoenergetycznymi wielkościami z symulacji MC.
- W rozdziale tym razi też określenie „objętość świata” dla środowiska, w którym funkcjonuje DNA, które wydaje się tożsame z określeniem „objętość ośrodka”.

Opis materiałów i metod niezbędnych do uzyskania danych radiobiologicznych prezentowanych w niniejszej pracy został przedstawiony przez Doktorantkę w kolejnym, 4 rozdziale pracy, który rozpoczyna się od dokładnej charakterystyki wybranej do analizy linii komórkowej V79. Następnie Autorka szczegółowo przekazuje informacje o wykorzystanej bazie danych radiobiologicznych PIDE, zestawiając jakościową i ilościową charakterystykę 1219 zestawów danych z licznych serii eksperymentów przeżywalności komórek po napromienieniu fotonami i jonami w warunkach *in vitro*. Omówiła szczegółowo zestawienie parametrów krzywych przeżywalności, tak właściwych dla promieniowania testowego, jak i referencyjnego, w celu wyjaśnienia źródeł występujących rozbieżności i wskazała ograniczenia otrzymanego zestawu danych.

Właściwy dla otrzymanych wyników rozdział piąty stanowi tę część, w której Autorka najpierw przedstawiła wyniki walidacji symulacji MC w oparciu o dane pomiarowe uzyskane przy pomocy licznika JC i wskazała zakresy ich stosowalności, a następnie dokonała zestawienia wielkości nanodozymetrycznych i radiobiologicznych.

W tym miejscu nasuwa się jednak prośba o dokładniejsze wyjaśnienie zgodności/rozbieżności symulacji MC z wynikami eksperymentalnym szczególnie dla klastrów o rozmiarze $v=2$, co widzimy na rysunku 5.1 na stronie 70 pracy.

Szczególną uwagę Autorka pracy poświęciła na weryfikację doboru danych eksperymentalnych i źródeł ich rozrzutu pod kątem sposobu przeprowadzania eksperymentu, rodzaju podtypu komórek V79, określania wartości LET czy przekroju czynnego na inaktywację.

Pani mgr Monika Mietelska jasno wskazała możliwości wynikające z wielkości opisujących zjawiska stochastyczne w nanoskali, w szczególności w aspekcie wielkości R_2 jako alternatywy dla parametru F_k . Wykazała, jak nowo proponowana wielkość odtwarza obserwowane makroskopowo trendy.

Ostatni rozdział pracy to podsumowanie otrzymanych rezultatów i wnioski z nich płynące. W tej części pracy pani mgr Monika Mietelska przedstawiła także możliwości rozszerzenia badań czy zastosowania wyników w dalszej perspektywie.

Komentarze i uwagi krytyczne

Całość pracy wykonanej przez panią mgr Monikę Mietelską oceniam bardzo wysoko tak za jakość jak i ilość przeprowadzonych pomiarów i symulacji komputerowych oraz za wnikliwą analizę uzyskanych wyników. Korzystając zarówno z przywilejów jak i obowiązku recenzenta, chciałbym wskazać na kilka dodatkowych, czysto „edytorskich” nieścisłości:

1. W kilku miejscach pracy autorka wymiennie używa określenia „lekkie/ciężkie cząstki naładowane” dla tych samych jonów co jest oczywiście nieistotne w ocenie wartości merytorycznej pracy, a wynika pewnie z literalnego odczytu przyjętego do realizacji tytułu pracy. I tak:
 - Na stronie 7 znajdujemy wymienne użycie wręcz w jednym zdaniu „... fizyk Robert Wilson jako pierwszy zaproponował leczenie nowotworów złośliwych za pomocą lekkich jonów (Wilson, 1946), co miało związek z wyjątkowymi właściwościami ciężkich cząstek naładowanych.”
 - Na stronie 9 pracy Autorka podaje, że „Przebieg strat energii wraz z głębokością w ośrodku dla wiązki ciężkich cząstek naładowanych wykazuje maksimum depozycji na końcu drogi cząstki.” – ale tak jest też dla „tytułowych” lekkich jonów (n. protonów czy jonów węgla) stanowiących treść rozprawy.
 - Analogiczne stwierdzenie znajdujemy na stronie 42 „Dla cięższych cząstek naładowanych (np. protonów, cząstek alfa czy jonów węgla) wartość liniowej zdolności hamowania S_{el} jest w przybliżeniu równa LET, w przeciwieństwie do lekkich cząstek (np. elektronów), gdzie straty energii na wytworzenie promieniowania hamowania czy elektronów δ nie są zaniedbywalne”.
2. Uznaję konieczność ewolucji języka polskiego adekwatnie do postępu i zmieniającego się opisu świata, lecz pojawiające się np. na stronie określenie „koncept” bardzo razi w odniesieniu do całości rozprawy napisanej niezwykle hermetycznym i bardzo poprawnym językiem.
3. Na stronie 36 podano, że „w przypadku linii komórkowej V79 literatura wskazuje, że wydajność ta (klonowania) wynosi między 70% a 100% „. Konieczne byłoby podanie tej wielkości dla prowadzonych w tej pracy eksperymentów z klonowaniem komórek chociażby w procedurze walidacji symulacji MC.
4. W pracy przyjęto „... poziom przeżywalności SF wynoszący 5%, dla którego obliczano przekroje czynne na inaktywację wprowadzając wielkość R_2 .” – lecz nigdzie nie znalazłem wyjaśnienia, dlaczego właśnie taki poziom został przyjęty.

Wnioski końcowe

Recenzowana dysertacja została napisana poprawnym językiem i nie mam zastrzeżeń do stosowanej terminologii. Dysertacja została zilustrowana przejrzystymi rysunkami, a wyniki w postaci liczbowej są przedstawiane w tabelarycznych zestawieniach. Wszystkie moje komentarze i uwagi krytyczne nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę tak przeprowadzonych badań naukowych jak i prezentacji otrzymanych wyników.

Jednocześnie stwierdzam, że otrzymany do recenzji materiał pozwala stwierdzić, że w trakcie studiów doktoranckich pani mgr Monika Alicja Mietelska wykazywała się dużym zaangażowaniem w badaniach naukowych, co potwierdzone zostało Jej publikacjami w

renomowanych czasopismach oraz wystąpieniami na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Otrzymane nagrody i wyróżnienia Dziekana Wydziału Fizyki UW świadczą również o Jej zaangażowaniu w działalność dydaktyczną.

W podsumowaniu stwierdzam, że:

- recenzowana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wnosi istotny wkład w zakresie rozumienia technik oddziaływania promieniowania jonizującego z materią biologiczną na poziomie subkomórkowym. Postawione przez panią mgr Monikę Alicję Mietelską cele naukowe zostały osiągnięte, a przedstawione w końcowym rozdziale pracy plany na przyszłość dają gwarancję dalszego rozwoju naukowego.
- **recenzowana praca doktorska spełnia wszelkie kryteria stawiane dysertacjom na stopień doktora nauk fizycznych, tj. oryginalność postawionego problemu naukowego i spójność tematyczną zbioru artykułów związanych merytorycznie z tematem rozprawy. Dlatego też wnioskuję o dopuszczenie pani mgr Moniki Alicji Mietelskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie jako recenzent Rozprawy chciałbym złożyć wniosek o wyróżnienie recenzowanej rozprawy a poniżej składam uzasadnienie.

Pani mgr Monika Alicja Mietelska przeprowadziła zarówno cały proces badawczy jak i jego prezentację w rozprawie w sposób wyróżniający. Pod względem naukowym wyjątkowość jej pracy polega na tym, że do opisu procesów oddziaływania promieniowania jonizującego z materiałem biologicznym wykazuje powiązanie określonych wielkości nanodozymetrycznych z wielkościami radiobiologicznymi, co jest nowatorskim podejściem do omawianego zagadnienia.

Jej praca doświadczalna oraz przeprowadzone symulacje komputerowe były dedykowane bezpośrednio do konkretnego układu komórek biologicznych i mogą zostać realnie wykorzystane przy aplikacjach klinicznych w planowaniu radioterapii. Otrzymane wyniki mogą i z pewnością zostaną wykorzystane do innych prac modelowych w analogicznych badaniach radiobiologicznych w kraju i na świecie.

Kielce, 15 listopada 2024 r.

