

Prof. dr hab. Jan Pluta

Warszawa, 25.01.2016r.

Wydział Fizyki Politechniki Warszawskiej
Tel: 22 234 7375, e-mail: pluta@if.pw.edu.pl

Dziekanat Wydziału Fizyki UW
Sekcja ds. pracowniczych
Wpłynęło dn. 2.9.01.2016
podpis

Recenzja rozprawy doktorskiej pani Urszuli Kaźmierczak

***Dawka lokalna i jej rola w biologicznej odpowiedzi
linii komórkowych ssaków in vitro***

Procesy fizyczne zachodzące podczas penetrowania ośrodka materialnego przez cząstki jonizujące są od dawna dobrze poznane, a opracowane z wykorzystaniem tej wiedzy programy komputerowe, np. GEANT, dobrze opisują wyniki pomiarów oraz pozwalają na projektowanie nowych urządzeń badawczych. Kiedy jednak chodzi o oddziaływania z organizmami żywymi, opis nie jest już taki prosty. Mamy wtedy bowiem do czynienia nie z bierną materią, ale z ośrodkiem, który w określony sposób reaguje na procesy w nim zachodzące. Reakcje żywych komórek na procesy jonizacji są już nieźle poznane, a radioterapia jest szeroko stosowana w zwalczaniu nowotworów. Jak jednak zmienione przez promieniowanie jonizujące komórki reagują z sąsiednimi komórkami? Czy nie indukują w nich zmian, a jeżeli tak, to jakie to są zmiany i od czego one zależą? Wyniki dotychczasowych badań nie są jednoznaczne, a przecież stawką jest zdrowie i życie ludzi...

Te właśnie zagadnienia są przedmiotem omawianej tu rozprawy doktorskiej. Praca została wykonana w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów Uniwersytetu Warszawskiego z wykorzystaniem wiązek jonów ^{12}C , przyspieszanych w cyklotronie U-200P. Stosowano także wiązki promieniowania X w ramach współpracy z Instytutem Chemii i Techniki Jądrowej.

Autorka rozpoczyna rozprawę od opisu procesów oddziaływania ciężkich cząstek naładowanych z materią w rozdziale pierwszym, skupiając uwagę na energii deponowanej w materii wskutek tych procesów w zależności od rodzaju i energii penetrującej ośrodek cząstki. Zwraca również uwagę, że nie tylko liniowy przekaz energii (LET) jest istotny dla efektów biologicznych w naświetlonych komórkach. Jako ważny przykład porównuje skutki oddziaływania z materią elektronów i fotonów w stosunku do oddziaływania hadronów i jonów. Pokazuje zasadniczą różnicę polegającą na tym, że w przypadku elektronów i fotonów energia deponowana jest równomiernie w całej komórce, podczas gdy w przypadku ciężkich cząstek naładowanych energia deponowana jest wzdłuż trajektorii cząstki, przy czym dawki lokalne osiągały ogromne wartości.

Informacje z pierwszego rozdziału stanowią bazę dla opisu biologicznych skutków promieniowania jonizującego na poziomie komórkowym, co jest treścią rozdziału drugiego. Wyróżnia tu zachodzące kolejno w czasie trzy fazy: fizyczną, chemiczną i biologiczną. Uszkodzenia komórek, w szczególności uszkodzenia DNA, w poszczególnych fazach mają różny charakter i zależą zarówno od rodzaju promieniowania jak i własności komórki. Na dalsze losy komórki zasadniczy wpływ mają procesy naprawy, które zależą od rodzaju uszkodzenia oraz od samego mechanizmu naprawy. Błędna naprawa prowadzi do powstania mutacji, co może być w dalszej konsekwencji przyczyną powstania nowotworu.

Szczególna uwaga poświęcona jest tzw. „efektowi sąsiedztwa”, czyli powstawania odpowiedzi biologicznej nienapromienionych komórek, jako skutek napromienienia innych komórek. Przegląd informacji literaturowych nie daje jednoznacznej odpowiedzi. Co więcej, samo „sąsiedztwo” nie musi koniecznie oznaczać bezpośredniej bliskości, a może dotyczyć także komórek odległych od miejsca napromienienia. W dalszej części rozważane są różne możliwe mechanizmy efektu sąsiedztwa. Za najbardziej prawdopodobne uważa się sygnały przekazywane drogą połączeń szczelinowych pomiędzy komórkami.

Skutki efektu sąsiedztwa mogą być zarówno pozytywne, jak i negatywne dla procesu radioterapii. Z jednej strony, może to rozszerzyć obszar niszczonej poza ten, objęty wiązką napromienienia. Z drugiej strony, może być przyczyną nowotworów wtórnych i różnego rodzaju powikłań w obszarach nienapromienionych. Ogólny wniosek jest taki, że efekt ten powinien zostać zbadany, jako istotny dla końcowych wyników terapeutycznych. Omawiana tu praca stanowi nowy element tych badań, a szczegółowe określenie jej celu zawiera rozdział trzeci.

W rozdziale czwartym zaprezentowana jest aparatura pomiarowa i opisane są stosowane metody pomiarowe. Wiązka jonów ^{12}C o energii 48 MeV pochodziła z cyklotronu U-200P Środowiskowego Laboratorium Ciężkich Jonów UW. Układ pomiarowy pozwalał na monitorowanie wiązki oraz na naświetlanie próbek biologicznych których ustawienie można było regulować oraz automatycznie zmieniać z pozycji komputera. W tym samym pomieszczeniu możliwe było również przygotowanie próbek biologicznych. Do rejestracji danych zastosowano układ elektroniczny działający w systemie CAMAC współpracujący z komputerem.

Pierwszym etapem pomiarów było badanie rozkładu natężenia promieniowania w miejscu, gdzie następnie umieszczano badaną próbkę. Badania realizowano przy pomocy detektora, którego położenie zmieniano automatycznie za pomocą robota sterowanego z komputera zapisując liczbę zaliczeń dla każdego położenia. W celu wyznaczenia dawki deponowanej w materiale biologicznym sprawdzono zarówno jednorodność rozkładu wiązki na badanej powierzchni, jak i to czy wiązka była monoenergetyczna. Wprowadzono szereg poprawek uwzględniających różne efekty techniki eksperymentalnej. Dla weryfikacji wykonano też pomiary z pomocą innych technik detekcyjnych np. samowyołującej się folii dozymetrycznej, czy dielektrycznych detektorów śladowych.

W dalszej części opisana jest procedura przygotowywania próbek biologicznych. Ten skomplikowany proces wymagał rozwiązania wielu problemów natury technicznej, wymagał też wyjątkowej uwagi i spełnienia warunków sterylności. Sterylizację radiacyjną elementów mających kontakt z badanymi komórkami wykonano w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej, ICHTJ, wykonując naświetlania wiązką wysokoenergetycznych elektronów.

Napromienianie komórek wiązką jonów węgla kontrolowane było wskazaniem licznika tak, aby zdeponowana została zaplanowana dawka promieniowania. Równomierny rozkład dawki na powierzchni próbki realizowano przez ruch stolika pomiarowego według zaprogramowanego schematu. Komórki napromieniano także promieniowaniem X w ICHTJ. Po napromienieniu próbki poddawane były dalszej obróbce, zgodnie z wybranym testem biologicznym.

Uszkodzenia biologiczne, będące rezultatem pochłonięcia znacznych dawek promieniowania badano z pomocą testu, który umożliwia analizę powstawania i zanikania dwuniciowych pęknięć DNA indukowanych przez promieniowania jonizujące. Sam test polega na zliczaniu ognisk naprawczych z pomocą mikroskopu fluorescencyjnego z automatycznym systemem pobierania i analizy obrazu. Wcześniej komórki poddawano złożonej i wielostopniowej procedurze obróbki, umożliwiającej następną ich wizualizację.

Wykonano także test klonogeny, który umożliwia określenie możliwości komórek do utrzymania ich zdolności reprodukcyjnych i tworzenia dużych kolonii. Test ten pozwala na badanie

przeżywalności komórek napromienionych różnymi dawkami promieniowania i może ocenić wrażliwość różnego typu komórek na pochłonięte dawki. Może być stosowany nawet dla bardzo małych dawek przez co jest często stosowaną metodą w badaniu wrażliwości komórek biologicznych na promieniowanie jonizujące lub związki chemiczne. Opisano szczegółowo procedurę przygotowania i wykonania tego testu.

Wyniki wykonanych pomiarów opisane są w rozdziale piątym. Najpierw przedstawiono rezultaty pomiarów jednorodności wiązki stosując w tym celu różne metody z włączeniem testów biologicznych. Pokazano, że jednorodność na badanej powierzchni jest zachowana z dokładnością do pojedynczych procent.

Zasadnicza część wyników dotyczy badania popromiennego efektu sąsiedztwa. Próbkę biologiczną naświetlano zarówno wiązką jonów węgla, jak i promieniowaniem X. Badania przeprowadzono na czterech grupach komórek: nienapromienionych i napromienionych, oraz na komórkach hodowanych z wraz z komórkami jednej i drugiej grupy. Badania prowadzono kilkoma metodami. Jedną z nich było liczenie mikrojąder, co wykonano sposobem manualnym i automatycznym. Wykonano szczegółowe analizy powtarzalności wyników i porównano wyniki dla obu sposobów liczenia uzyskując zadowalającą statystycznie zgodność i wiarygodność rezultatów.

Następnym elementem analizy było zbadanie zależności częstości występowania mikrojąder w funkcji dawki promieniowania. Pomiary wykonano dla kilku dawek, oraz dla promieniowania X i wiązki jąder węgla. Zaobserwowano wzrost częstości występowania mikrojąder ze wzrostem dawki. Nieco większe wartości były dla naświetlania wiązką jąder węgla. Zasadniczym wnioskiem było stwierdzenie, że częstość występowania mikrojąder w komórkach sąsiednich, hodowanych wspólnie z komórkami napromienionymi promieniowaniem X nie różniła się w zakresie niepewności statystycznych od odpowiadających im częstościom w komórkach kontrolnych. Większą częstość zaobserwowano w przypadku naświetlania jądrami węgla jednak mieszczącą się w granicach trzech odchyłeń standardowych. Test ten nie wykazał więc istnienia efektu sąsiedztwa.

Badania wykonano również za pomocą testu klonogenego. Stwierdzono, że wydajność klonowania dla komórek kontrolnych była wyraźnie niższa w przypadku komórek napromienionych i zależna od zdeponowanej dawki promieniowania. Równocześnie nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy wydajnością klonowania komórek sąsiednich, a wydajnością klonowania odpowiadających im komórek kontrolnych. Test ten wykazał więc również brak występowania efektu sąsiedztwa.

Zbadano też korelację pomiędzy wynikami obu testów. Zaobserwowano, że z większą częstością występowania mikrojąder związane jest obniżenie zdolności komórek do tworzenia kolonii i obniżenie przeżywalności danej próbki komórek. Jest to zrozumiałe bo w obu przypadkach przyczyną zmian jest zwiększenie liczby uszkodzeń DNA wskutek zdeponowanej dawki promieniowania.

Oceniając całość wykonanych badań i uzyskanych wyników warto zwrócić uwagę, że praca dotyczy tematyki szczególnie ważnej obecnie w Polsce, kiedy uruchamia się możliwość terapii wiązkami hadronów i jonów. Natomiast efekt sąsiedztwa, badany szczegółowo w tej pracy, to zarówno możliwość, jak i zagrożenie. Poznanie własności tego efektu, jego wpływ lub brak wpływu na nienaświetlone komórki, powinien być nie tylko zbadany, ale również uwzględniany w zastosowaniach praktycznych, jeśli w wyniku badania, okaże się istotny. Fakt, że dane literaturowe nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków dopinguje w oczywisty sposób do zainteresowania tym tematem. Dlatego uważam, że podjęta w tej pracy tematyka jest z punktu widzenia naukowego aktualna, a wyniki mogą znaleźć zastosowania praktyczne.

Trudności w wyciągnięciu jednoznacznych wniosków z opublikowanych już badań dotyczących efektu sąsiedztwa wynikają między innymi z faktu, że efekt ten może być zależny od deponowanej dawki, może też zależeć od rodzaju padającego promieniowania, np. fotonów lub ciężkich jonów ze względu na różnice w ich oddziaływaniu z materią. Dlatego w omawianej tu pracy badania prowadzono dla dawek od 0.1 Gy do 4 Gy dla wiązek fotonów i jąder węgla. Te dwa typy promieniowania różnią się zasadniczo swymi własnościami deponowania energii charakteryzowanymi wartościami LET, a także rozkładem przestrzennym deponowanej w materiale biologicznym dawki.

Wyniki zaprezentowane w tej pracy pozwalają na wyciągnięcie wniosku o braku efektu sąsiedztwa w analizowanej linii komórkowej CHO-K1. Opisana szczegółowo metodyka prowadzenia badań: przygotowanie próbek, kalibracja aparatury, zastosowanie różnych procedur badawczych, analiza niepewności pomiarowych itd. pozwala z zaufaniem przyjmować wnioski z uzyskanych rezultatów. Złożoność problemu pokazuje wyraźnie przedstawiony w końcowym rozdziale przegląd wyników literaturowych, wśród których umiejscowiono wyniki wykonanych w tej pracy analiz. Przy okazji nietrudno zauważyć, że autorka stała się prawdziwym ekspertem w tej trudnej interdyscyplinarnej dziedzinie wiedzy.

Końcowe zdanie rozprawy zawiera stwierdzenie, że efekt sąsiedztwa jest procesem złożonym, którego mechanizmy wciąż pozostają niejasne i wymagają dalszych badań. Oceniając wysoko treść pracy, wykonane badania i uzyskane wyniki oraz wynikający z tego poziom naukowy autorki, chciałoby się dowiedzieć jak autorka widzi kontynuację pracy, w którą włożyła tak wiele trudu. Na pewno jest kompetentna, by taką wizję nakreślić, nie ma tego jednak w treści rozprawy. Przykładem uzupełniających badań mogłoby być np. modelowanie komputerowe dedykowane oddziaływaniu promieniowania z materiałami biologicznymi.

Uwaga ta nie pomniejsza jednak wysokiej oceny przedstawionej do recenzji rozprawy.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane w przewodach doktorskich i wnoszę o dopuszczenie jej autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jan Pluta