

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

***Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Adrianny Tartas***

**„Wpływ wiązek mieszanych promieniowania jonizującego na dynamikę naprawy
uszkodzeń DNA w komórkach U2OS”**

Rozprawa doktorska „*Wpływ wiązek mieszanych promieniowania jonizującego na dynamikę naprawy uszkodzeń DNA w komórkach U2OS*” autorstwa mgr Adrianny Tartas została wykonana w Zakładzie Fizyki Biomedycznej Instytutu Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem dr hab. Beaty Brzozowskiej i dr. hab. Jarosława Żygierewicza, profesora UW. Treść rozprawy została zawarta na 100 stronach w 8 rozdziałach i zakończona trzema załącznikami.

Ukrytym, lecz oczywistym celem wszelkich badań radiobiologicznych jest poznawanie wpływu oddziaływania promieniowania jonizującego na komórki biologiczne, co jest niezwykle istotne w aspekcie terapii nowotworowych z wykorzystaniem promieniowania jonizującego oraz w aspekcie ochrony radiologicznej ludzi.

Jedną z najczęstszych przyczyn zgonów wśród ludzi na całym świecie są choroby nowotworowe. W ostatnich latach w Polsce corocznie diagnozowanych jest ponad 170 tys. pacjentów, wśród których jest duża grupa, dla których innowacyjne techniki leczenia z wykorzystaniem zewnętrznych źródeł promieniowania jonizującego są jedyną szansą na wyleczenie lub znaczną poprawę stanu zdrowia. Z tego względu wszelkie badania zmierzające do wyjaśnienia procesów badania skutków promieniowania jonizującego są niezwykle istotne, gdyż mogą przyczynić się do indywidualnej optymalizacji leczenia, która jest nakazana poprzez polskie i europejskie prawo. Analogiczne procesy oddziaływania promieniowania jonizującego z komórkami człowieka występują w środowisku naturalnym, gdyż na promieniowanie pochodzące z naturalnych, jak i sztucznych źródeł organizm ludzki jest narażony każdego dnia.

Określenie ewentualnego niebezpieczeństwa związanego z ekspozycją na promieniowanie jonizujące jest jednym z głównych celów badań nad promieniowaniem. Prowadzone w tym zakresie eksperymenty dostarczają informacji o indukowanych przez promieniowanie uszkodzeniach materiału genetycznego. Ważnym jest zrozumienie odpowiedzi materiału biologicznego poddanego działaniu różnych rodzajów promieniowania jonizującego jednocześnie lub w krótkich odstępach czasu (radioterapie frakcjonowanej). Narażenie na promieniowanie mieszane może mieć miejsce podczas wypadków radiacyjnych, lotów samolotem, a zwłaszcza w trakcie misji kosmicznych, gdzie promieniowanie takie jest wynikiem oddziaływania promieniowania kosmicznego z osłonami statków kosmicznych. Dlatego też wiele ośrodków prowadzi badania z zakresu radioterapii lub medycyny nuklearnej

z wykorzystaniem różnych rodzajów promieniowania jonizującego. Podwójnoniciowe uszkodzenia DNA są szczególnie szkodliwą formą powstających uszkodzeń, których stopień złożoności jest zależny od czynnika je wywołującego. W reakcji na tego typu uszkodzenia komórki inicjują wieloetapowy proces odpowiedzi biologicznej.

W odpowiedzi na zasygnalizowane wyżej procesy, celem pracy postawionym przez mgr Adriannę Tartas, było zbadanie wpływu sekwencyjnych wiązek mieszanych promieniowania jonizującego α oraz γ na odpowiedź biologiczną komórek nowotworowych kostniakomięsaka (U2OS), który jest najczęstszym nowotworem złośliwym kości u dzieci. Na narzucające się w tym miejscu pytanie „Dlaczego ten typ nowotworu, a nie inny?” pewnie odpowiedzią byłoby „A dlaczego nie ten.”

Przeprowadzone przez doktorantkę badania obejmowały analizę powstawania i zanikania ognisk naprawczych, będących odpowiedzią materiału biologicznego na zaistniałe zaburzenia, ich rozmiaru, intensywności oraz ruchliwości. Porównane zostały skutki napromienienia komórek promieniowaniem α i γ stosowanymi osobno oraz sekwencyjnie z uwzględnieniem różnej ich kolejności. Do obserwacji ognisk naprawczych w postaci białek NBS1 został użyty mikroskop fluorescencyjny do obrazowania żywych komórek w czasie rzeczywistym.

W przedstawionym mi do oceny manuskrypcie omawiane są przez Doktorantkę dwa odrębne zagadnienia, tj. a) badania z zakresu metod przygotowania i analizy materiału biologicznego, które z racji mojego doświadczenia mogę zrecenzować tylko od strony formalnej zgodności z omawianymi zagadnieniami i logiczności ich przedstawienia, oraz b) zagadnienia związane z fizyką oddziaływania promieniowania i jego dozymetrią (czy mikrodozymetrią), mające istotny wpływ na końcowe rezultaty, co do których moja recenzja będzie bardziej dogłębna.

Treść rozprawy

Praca została podzielona przez autorkę na 8 niezależnych rozdziałów, a spis tematycznej literatury przedstawiony na 17 stronach stanowi o erudycji pani mgr Adrianny Tartas i jest potwierdzeniem znajomości tematu. Całość pracy została wzbogacona wieloma rysunkami oraz tabelami z wynikami badań. Dodatkowo, Autorka zamieściła Załączniki z danymi ułatwiające weryfikację otrzymywanych wyników. Innowacyjnym rozwiązaniem jest zamieszczenie danych eksperymentalnych w bazie European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), które są dostępne na stronie internetowej.

W pierwszym rozdziale rozprawy „Wprowadzenie” pani mgr Adrianna Tartas przedstawiła niezbędne dla czytającego podstawowe wiadomości wprowadzające w zagadnienia wpływu promieniowania jonizującego na nasze funkcjonowanie. W rozdziale tym zdefiniowała również cel swojej pracy i wynikające z tego zagadnienia do rozwiązania oraz omówiła układ pracy. Tutaj znajdujemy też odsyłacze do 4 publikacji w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach naukowych stanowiących podstawę pracy doktorskiej oraz do 4 innych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, których jest autorką lub współautorką.

W rozdziale 2 „*Oddziaływanie promieniowania jonizującego z materią*” Doktorantka przedstawiła teoretyczne podstawy związane z fizycznymi i radiobiologicznymi zagadnieniami oddziaływania promieniowania jonizującego z materią ze szczególnym naciskiem na materię biologiczną i różne etapy oddziaływania promieniowania pierwotnego i wtórnego.

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.

W rozdziale tym znajdujemy również opis struktury DNA i jej środowiska jakim jest komórka oraz szczegółowy opis uszkodzeń materiału biologicznego na poziomie DNA indukowanych promieniowaniem. Przedstawiła tu również efekt wzmożenia tlenowego komórki i jego wpływ na odporność komórki na promieniowanie. Zagadnienie to wydaje się być szczególnie istotne z uwagi na prowadzone przez Autorkę badania eksperymentalne.

W końcowej części rozdziału 2 Doktorantka omówiła różnorodne mechanizmy identyfikacji, sygnalizacji i naprawy uszkodzeń DNA, czego wyznacznikiem są aktywowane białka tworzące mikroskopijnie widoczne ogniska w obrębie jądra komórkowego, których częstotliwość i wielkość jest związana z rozmiarem uszkodzeń. Wyniki obserwacji Autorki będą się opierały na analizie właśnie tego rodzaju białek.

Kolejny rozdział pracy zatytułowany „*Badania radiobiologiczne*”, 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.

W rozdziale tym Doktorantka podała niezbędne informacje nt. badań *in vitro* związane z pomiarami przeżywalności komórkowej, różnorodnych aberracji chromosomowych czy ognisk naprawczych i ich ruchliwości, co stanowiło główny wynik eksperymentalny Autorki. Ogniska zawierające białko naprawcze poruszają się wewnątrz komórek i badanie ruchliwości pozwala zrozumieć dynamikę procesów naprawy DNA oraz reakcję komórek na działanie promieniowania jonizującego.

Modelowanie skutków oddziaływania promieniowania z materiałem biologicznym metodami Monte Carlo jest cennym podejściem w badaniach radiobiologicznych. Metoda MC pozwala na symulację oddziaływań promieniowania na poziomie nanoskopowym, dostarczając wglądu w depozycję energii i wynikające z niej skutki biologiczne. Istnieje wiele narzędzi do modelowania metodami Monte Carlo, które są stosowane w tego rodzaju badaniach. W rozdziale tym Autorka podaje tu główne cechy takich kodów komputerowych jak PARTAC, który został stworzony do modelowania transportu elektronów, protonów, cząstek α przez różne materiały czy Geant4-DNA wykorzystany specjalnie do modelowania i przewidywania biologicznych uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem jonizującym.

Stosowane w trakcie prowadzenia pracy materiały i metody zostały przedstawione przez Autorkę w rozdziale 4.

Autorka opisała dokładnie stosowaną linię komórkową, sposób jej przechowywania, wysiewania, klonowania itd. Rozumiem, że te procedury postępowania są standardowymi, powszechnie stosowanymi i normowane w celu możliwości porównywania wyników badań z różnych eksperymentów i laboratoriów.

W rozdziale tym Autorka podaje, że „*W dniu napromieniania szkiełko nakrywkowe z komórkami było umieszczane na poliamidowej płytce i przykrywane folią Mylar, Następnie płytka była umieszczana w urządzeniach do napromieniania materiału biologicznego.*” U niespecjalisty rodzi się pytanie, czy nie zmienia to środowiska komórek i nie wpływa na stopień ich hipoksji, co jak wynika ze studiowanego manuskryptu istotnie wpływa na reakcję komórek na napromienianie.

„*Układ eksperymentalny*” został przedstawiony w rozdziale 4.2 niniejszej pracy. Autorka wykorzystwała do swoich badań promieniowanie jonizujące w postaci cząstek α otrzymywanych z dedykowanego źródła ^{241}Am oraz promieniowania gamma ze źródła ^{137}Cs . Wybór tych rodzajów promieniowania był podyktowany różnicą w sposobie ich oddziaływania z materią, co w konsekwencji oznaczało różny rodzaj indukowanych uszkodzeń materiału genetycznego zawartego w komórkach. Zastosowanie tych dwóch rodzajów promieniowania pociągało za sobą konieczność wykorzystania dedykowanych rozwiązań technicznych – tj. układu AIF08 (stanowiącego część urządzenia MAX) do napromieniania cząstkami alfa i układu Scanditronix IC900 do napromieniania kwantami gamma. Podana przez Autorkę (i wykorzystana w obliczeniach) moc dawki promieniowania w obydwóch systemach wynosiła odpowiednio 0.223 Gy/min i 0.372 Gy/min. Nasuwające się w tym miejscu pytanie to to, czy podane moce dawki są danymi producentów, czy są wynikiem pomiarów własnych (jeśli tak to jak to zmierzono) oraz czy podane moce uwzględniają realną geometrię napromieniania tego eksperymentu?

W dalszej części rozdziału Autorka definiuje cztery scenariusze napromieniania materiału komórkowego, tj. (I) *napromieniane cząstkami α w urządzeniu MAX*, (II) *napromieniane promieniowaniem γ w komorze Scanditronix*, (III i IV) *napromienianie wiązkami mieszanymi: γ po α i α po γ z uwzględnieniem przenoszenia materiału biologicznego z jednego urządzenia do drugiego*. W pewnym miejscu rozdziału Autorka pisze, „*Czas napromieniania potrzebny do dostarczenia 1,7 Gy promieniowania α wynosił 7 min 32 s. Dostarczenie 2 Gy promieniowania γ zajęło 5 min 37 s. Rozbieżności między dawkami promieniowania α i γ wynikają z niedokładności w obliczeniach dotyczących mocy dawki promieniowania α , które zostały dostrzeżone po zakończeniu eksperymentu.*” Rozumiem, że zamiarem było dostarczenie takiej samej dawki promieniowania. Rodzi się pytanie na czym polegały te „*niedokładności w obliczeniach dotyczących mocy dawki promieniowania α* ” i z czego wynikła ta różnica, która jak rozumiem była nieistotna z uwagi na przewidywane rezultaty eksperymentu. Natomiast dla wiązek mieszanych Doktorantka wybrała dawkę średnią z dawek promieniowania α i γ . Rodzi się tutaj pytanie czy takie rozwiązanie wpływa na ostateczny rezultat wyników eksperymentalnych.

W rozdziale tym Autorka przedstawiła opis procedury przygotowania napromienionych hodowli komórkowych do obserwacji jąder komórkowych pod mikroskopem fluorescencyjnym i opis prowadzenia i rejestracji obrazów mikroskopowych. Jednak z uwagi

na mierzone w ramach eksperymentu wielkości fizyczne brakuje mi tutaj dokładniejszego opisu skalowania mikroskopu fluorescencyjnego, gdyż akapit temu poświęcony „*Na początku wszystkie obrazy uzyskane z mikroskopu zostały przeskalowane. Przypisanie rzeczywistych jednostek długości do pikseli było możliwe dzięki wykonaniu pod mikroskopem obrazu referencyjnego, który zawierał podziałkę liniową.*” wydaje się niewystarczający. W tym miejscu nasuwają się tutaj pytania:

- a) Jakie były rzeczywiste mierzone długości i z jaką dokładnością wyznaczone?
- b) Po zdaniu „*Następnie obliczone zostało położenie jego środka masy w danym punkcie czasowym*” oczywistym pytaniem jest, jak wyznaczone było położenie środka masy jądra (czy geometrycznego środka jądra), bo w miarę prostym pomiarem będzie pomiar dla jąder kulistych, lecz czy jądra były faktycznie kuliste i z jaką dokładnością to robiono? Jak pokazano na rysunku 3.4 niniejszej pracy, jądra komórkowe nie są idealnie kuliste, więc konieczne jest wyjaśnienie tego zagadnienia. Innym nasuwającym się pytaniem jest czy kształt jądra komórkowego ulega zmianie w trakcie pomiaru (około 300 min)?
- c) Czy rozmiar ognisk naprawczych był wyznaczany z pomiaru promienia koła czy z pomiaru liczby pixeli zawartych w definiowanej przez Autorkę obwiedni ogniska?
- d) Jak wyznaczana była intensywność ognisk naprawczych, w jakich jednostkach i z jaką dokładnością?

Zmiana położenia ogniska naprawczego była wyznaczana poprzez śledzenie jego współrzędnych w funkcji czasu i wyznaczenie średniego kwadratowego przemieszczenia. Otrzymane wyniki Doktorantka opisała funkcją modelu subdyfuzji, dla której wyznaczyła parametry promienia dyfuzji oraz współczynnika dyfuzji.

Pomiar dawki promieniowania jonizującego, deponowanej w komórkach biologicznych i w ich jądrach jest kluczowy dla dokładnego określenia efektu biologicznego, jaki może wywołać. Istotnym jest więc przeprowadzony zakres prac i opisany w rozdziale 5 związany z szacowaniem wielkości depozycji dawki w różnych układach pomiarowych dla różnych rodzajów promieniowania. Wskutek różnic w sposobie oddziaływania promieniowania α i γ z materiałem biologicznym, konieczne było zastosowanie różnych technik pomiarowych. Z uwagi na oczywiste problemy wynikające z fizyki oddziaływania cząstek α z materią dozymetria w tym przypadku przeprowadzona została techniką symulacji MC, podczas gdy dla promieniowania γ w komorze Scanditronix z wykorzystaniem metod fizycznych i dozymetrów przeznaczonych do pomiarów promieniowania fotonowego.

Dla stosowanego źródła promieniowania α Autorka oszacowała parametry dozymetryczne z przeprowadzonych symulacji MC z wykorzystaniem kodów PARTRAC i Geant4. Niezbędną do symulacji charakterystykę widma promieniowania α dla stosowanego źródła ^{241}Am i pomiar jednorodności jego aktywności powierzchniowej Doktorantka wykorzystowała z przeprowadzonych przez prof. Zygmunta Szeplińskiego ze współpracownikami pomiarów z wykorzystaniem detektora Si (ORTEC, USA) i oprogramowania SRIM. Pewien niedosyt budzi tutaj niewłączenie chociaż wynikowych danych z tych pomiarów.

W części pracy, w której Autorka opisuje wstępne symulacje dozymetryczne dla promieniowania α rodzą się pytania o cel symulacji dla układów pomiarowych różnych

od stosowanego z wykorzystaniem systemu MAX, tj. dla czterech różnych scenariuszy napromieniania „Pierwszym z badanych scenariuszy było napromienienie monowarstwy komórek wysianych na szkiełku o grubości 150 μm , które było umieszczane bezpośrednio na źródle powierzchniowym (Rysunek 5.1A). W drugim schemacie komórki były napromieniane od góry (Rysunek 5.1B). Cząstki α przechodziły przez ochronną warstwę folii Mylar o grubości 3 μm , a następnie przez warstwę pożywki (6 μm). W ostatnim schemacie, pomiędzy folię Mylar a źródło, dodany został kolimator o grubości 5 mm.” skoro realne napromienianie cząstkami α odbywało się wg scenariusza drugiego z dwoma zastrzeżeniami: a) podana wcześniej grubość folii Mylarowej wynosiła 2.5 μm , b) jak realnie została wyznaczona warstwa pożywki, której grubość w procedurze symulacji określono restrykcyjnie na 6 μm . Jednocześnie niejasnym jest dla mnie cel zastosowania „jakiegoś” kolimatora w trzecim i czwartym schemacie, gdyż podano tylko jego grubość, a stwarzać to może dodatkowe problemy eksperymentalne związane ze stratą energii w warstwie powietrza. Rezultaty przeprowadzonych symulacji oddziaływania cząstek α z materiałem biologicznym Doktorantka przedstawiła w rozdziale 5.2.1 pracy, tj. otrzymane rozkłady energii deponowanej w jądrze komórkowym, liczby torów cząstek α oraz wartości LET.

Rozkład deponowanej energii przez cząstki α ze stosowanego źródła ^{241}Am został wyznaczony z wykorzystaniem narzędzi do symulacji PARTRAC i Geant4. Rozkłady energii zdeponowanej powstały na podstawie symulacji wykonanych dla 1000 jader komórkowych, dla dwóch różnych wartości dawek ($D_1 = 1,22 \text{ Gy}$ i $D_2 = 2,33 \text{ Gy}$). Niejasnym jest jednak dla mnie w tym miejscu rozbieżność warunków napromieniania dla obydwóch stosowanych kodów MC oraz ich niezgodność z realnymi warunkami napromieniania. Wyjaśnienia na pewno wymaga przyjęcie punktowego źródła w odległości 10 μm od jądra komórkowego (kod PARTRAC) i różnych konfiguracji napromieniania (kod Geant4). Oczywiście jest więc pytanie na ile otrzymane wartości symulacji prezentowane w rozdziale 5.2.1 można porównywać między sobą i na ile te symulacje odzwierciedlają realną sytuację napromieniania w urządzeniu MAX. Rozkłady wartości LET w monowarstwie komórek zostały wyznaczone za pomocą kodu Geant4 dla wymienionych wcześniej czterech konfiguracji ekspozycji na promieniowanie α .

Wydaje się, że oprócz powyżej przebadanych parametrów napromieniania, w eksperymentach radiobiologicznych również jednorodność napromieniania hodowli komórkowych jest kluczowym parametrem i dlatego Autorka dokonała takich symulacji

z wykorzystaniem filmów radiochromowych EBT3, kalibrowanych certyfikowanym źródłem i komorą jonizacyjną. Tutaj jednak procedura normalizacji odbywała się poprzez wykorzystanie źródła promieniowania X (lampy rtg) znajdującego się w urządzeniu MAX, a właściwe pomiary były prowadzone w urządzeniu Scanditronix przy innej energii promieniowania. W pracy nie znajduję jednak informacji o braku lub małej zależności odpowiedzi filmów EBT3 z energią promieniowania.

Przeprowadzona analiza, do której zostały wykorzystane filmy radiochromowe oraz dozymetr krzemowy, potwierdziły poprawność wartości mocy dawki źródeł znajdujących się w urządzeniu Scanditronix wyznaczonej przez Laboratorium Metrologii przy Szwedzkim

Urzędzie ds. Bezpieczeństwa Promieniowania i w czasie wykonywania eksperymentów, moc dawki promieniowania fotonowego emitowanego ze źródeł ^{137}Cs wynosiła 0,372 Gy/min.

Otrzymane przez panią mgr Adriannę Tartas wyniki opisujące wpływ oddziaływania promieniowania jonizującego na komórki U2OS zostały przedstawione w dwóch kolejnych rozdziałach pracy, tj. w rozdziale 6 zatytułowanym „Charakterystyka ognisk naprawczych” i w rozdziale 7 „Mobilność ognisk naprawczych”.

Autorka w swojej pracy przeanalizowała 545 jąder poddanych określonym sposobom napromieniania. Biorąc pod uwagę całkowitą liczbę badań koniecznych do przeprowadzenia, liczbę jąder odrzuconych, czyli liczbę odrzuconych szkiełek z napromienianymi komórkami ze względów czysto technicznych wynikających np. ze zmiany warunków obserwacji pod mikroskopem fluorescencyjnym, czy nieudanych hodowli, przeprowadzonych symulacji komputerowych, czasu niezbędnego na wykonanie powyższego i czasu na przeprowadzenie analizy otrzymywanych danych, jestem pod wielkim wrażeniem stopnia determinacji w prowadzonych badaniach.

Głównym celem pracy było sprawdzenie odpowiedzi komórek z linii U2OS na działanie promieniowania γ i α oraz na kombinację obu typów promieniowania w przyjętej proporcji 46% do 54%. Do analizy został wykorzystany mikroskop służący do obrazowania w czasie rzeczywistym żywych komórek oraz tworzenia i dynamiki ruchu ognisk naprawczych obrazowanych poprzez wybarwione białko NBS1, które łączy się z konkretnymi obszarami chromatyny w miejscach wystąpienia podwójnoniciowych uszkodzeń DNA i pozostaje tam w trakcie procesu naprawy. Końcowe wyniki pani mgr Adrianna Tartas otrzymała w wyniku analizy zarejestrowanych filmów poklatkowych w czasie do około 300 min od zakończenia napromieniania. Przeprowadzona analiza obrazów umożliwiła pomiar liczby ognisk, ich rozmiaru, intensywności oraz ich mobilność.

Wyniki dotyczące kinetyki powstawania ognisk naprawczych NBS1 oraz ich zanik Doktorantka wzbogaciła pomiarami i analizą ich powierzchni (wyrażanej w μm^2), która odzwierciedla stopień złożoności uszkodzeń DNA. Autorka wykazała, że powierzchnia ta jest większa w jądrach komórkowych poddanych działaniu promieniowania α w porównaniu z promieniowaniem γ . W pracy nie znajdujemy jednak informacji na temat metodyki wyznaczania tej powierzchni (czy wyznaczana była z obwiedni ogniska i liczby pikseli czy z promienia) oraz dokładności tej procedury.

Pani mgr Adrianna Tartas poddała też analizie średnią intensywność fluorescencji ogniska, normalizowaną do intensywności całego jądra komórkowego jako miarę całkowitej ilości białka naprawczego, którego wielkość była korelowana do wywołanego zaburzenia. Zaobserwowany wynik wskazuje, że największa całkowita wartość intensywności ognisk występuje w komórkach poddanych działaniu kombinacji $\alpha \rightarrow \gamma$ natomiast najniższe wartości występują dla kombinacji $\gamma \rightarrow \alpha$. Najbardziej wyraźny spadek całkowitej intensywności zaobserwowała dla komórek napromienionych cząstkami α . Autorka wykazała, że synergia między skutkami napromienianiem pod względem opóźnionej naprawy wystąpiła jedynie w przypadku sekwencji $\alpha \rightarrow \gamma$. W przypadku sekwencji $\gamma \rightarrow \alpha$ zaobserwowana została szybka naprawa, a liczba ognisk spadła poniżej oczekiwanej wartości, osiągając prawie poziom ognisk wywołanych przez cząstki α . Oznacza to, że po zastosowaniu kombinacji $\alpha \rightarrow \gamma$, proste

pęknięcia dwuniciowego DNA wywołane promieniowaniem γ zostały szybko naprawione, pozostawiając jedynie złożone uszkodzenia na końcu 300-minutowej obserwacji. Ten szybki zanik ognisk w jądrze komórkowym w przedziale 50–100 minut naprawy tłumaczy tym, że obecność uszkodzeń wywołanych promieniowaniem o niskim LET przed uszkodzeniem wywołanym wysokim LET przyspiesza aktywację mechanizmów naprawczych DNA. Wyniki mogą sugerować, że synergia pomiędzy tymi dwoma rodzajami promieniowania jest wynikiem ich interakcji, która wyraża się poprzez początkowe uszkodzenia DNA oraz opóźnioną naprawę. Otrzymane wyniki potwierdzają hipotezę, że złożone uszkodzenia wywołane wysokim LET angażują mechanizmy naprawcze na tyle intensywnie, że uszkodzenia o niskim LET nie są efektywnie naprawiane lub naprawa tych uszkodzeń wykracza poza czas obserwacji ognisk objęty badaniem.

Dodatkową informację nt. mechanizmów odpowiedzi komórkowej na wiązki mieszane Autorka otrzymała w wyniku analizy wielkości obszarów, w których złożone uszkodzenia objawiają się dużymi ogniskami. Obserwowany wzrost wielkości ognisk naprawczych po 120 minutach od czasu napromieniania, po ekspozycji na sekwencyjne wiązki mieszane ($\alpha \rightarrow \gamma$) tłumaczy nagromadzeniem uszkodzonych fragmentów DNA, które są trudne do naprawienia i przyciągają większą ilość białek zaangażowanych w naprawę. Jest to proces, w którego trakcie te obszary wydają się łączyć, co może pomóc w skoordynowanej naprawie.

W swojej pracy pani mgr Adrianna Tartas wykazała jednocześnie, że badane ogniska naprawcze, które powstają w wyniku działania promieniowania jonizującego, poruszają się w obrębie jądra komórkowego, wykazując podobieństwo do ruchów Browna, tj. przebiegają według nieprzewidywalnego i stochastycznego wzorca w środowisku komórkowym. Dla każdego ogniska Autorka wyznaczała współrzędne jego położenia na obrazie i wyznaczała średnie przemieszczenie kwadratowe (MSD) będące miarą jego przemieszczenia z położenia odniesienia, którym według Niej był środek masy jądra komórkowego, co było kluczowym dla zbadania tylko ruchu ogniska w obrębie jądra. Ogniska, które zostały indukowane we wszystkich scenariuszach napromieniania, wykazywały szybką, lokalnie ograniczoną ruchliwość przez pierwsze 40-50 minut. Po około 1 godzinie od rozpoczęcia obserwacji wartość MSD osiągała plateau.

W podsumowaniu swojej pracy Autorka stwierdza, że „w przypadku sekwencyjnego narażenia na mieszane wiązki o niskim i wysokim LET, kolejność napromieniania w różny sposób wpływa na odpowiedź komórkową i mechanizmy naprawy. Wydaje się, że po ekspozycji komórek na promieniowanie o niskim, a później wysokim LET, komórki angażują się w naprawę złożonych uszkodzeń wywołanych promieniowaniem o wysokim LET w takim stopniu, że uszkodzenia wywołane promieniowaniem o niskim LET są naprawiane z opóźnieniem. Wynik ten daje wgląd w czasoprzestrzenną organizację procesów naprawy DNA, która może być modulowana przez obecność uszkodzeń o różnej złożoności w jądrze komórkowym”. Mimo przeprowadzonych badań z wykorzystaniem sekwencyjnych wiązek mieszanych nie zdołała jednoznacznie stwierdzić, która z wcześniej przedstawionych hipotez wyjaśniających uzyskane efekty biologiczne jest prawdziwa. W rezultacie w podsumowaniu wyników swojej pracy stwierdziła, że dodatkowym, interesującym podejściem do dalszych badań mogłoby być śledzenie

tworzenia się ognisk w trzech wymiarach za pomocą mikroskopii konfokalnej. Analiza 3D umożliwiłaby zbadanie w trzecim wymiarze ognisk, których nie udało się wykryć ze względu na ich nakładanie się.

Komentarze i uwagi krytyczne

Całość pracy wykonanej przez panią mgr Adrianę Tartas oceniam wysoko tak za jakość jak i ilość przeprowadzonych pomiarów i symulacji komputerowych oraz za wnikliwą analizę uzyskanych wyników. Powstałe w trakcie lektury pracy uwagi krytyczne i zapytania, które wymienilem w treści recenzji wskazują na pewien pośpiech w redagowaniu wersji końcowej pracy bez odniesienia się do informacji zawartych w Jej opublikowanych materiałach w recenzowanych czasopismach naukowych. W wielu miejscach takie odniesienia poprawiłyby zrozumienie podstaw, dlaczego zastosowano takie czy inne rozwiązanie. Korzystając zarówno z przywilejów jak i obowiązku recenzenta, chciałbym jednak wskazać na kilka dodatkowych, czysto „edytorskich” nieścisłości:

1. We wzorze 2.1 konieczny byłby dopisek, że jednostki drogi są wielkościami masowymi nie liniowymi.
2. Str.7 głównym produktem „ubocznym” rozpadu izotopu ^{241}Am jest promieniowanie γ o energii 59,54 keV. Tutaj jednak w kontekście oddziaływania z komórkami nie zapominajmy o charakterystycznym promieniowaniu X produktu rozpadu, czyli o promieniowaniu ^{237}Np i poszukiwanie odpowiedzi na pytanie, czy to promieniowanie uwzględniono w dozymetrii tej pracy, czy to promieniowanie uwzględniono w rezultatach oddziaływania z komórkami U2OS.
3. Dla założonych scenariuszy napromieniania i podanych mocy dawek poszczególnych źródeł wyliczone dawki różnią się o kilka procent w stosunku do cytowanych w pracy.
4. Czy uwzględniono straty energii cząstek α w warstwie powietrza źródło-materiał biologiczny.
5. Z jakim błędem oszacowana jest dawka absorbowana w komórce i jaki ma to wpływ na końcowe wyniki analizy?

Wnioski końcowe

Rozprawa 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.

Pomimo wymienionych w mojej recenzji drobnych uwag wysoko oceniam wartość przedstawionej rozprawy doktorskiej i uważam, 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 Adrianę Tartas 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 Adrianny Tartas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Kielce, 29 stycznia 2024 r.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized, cursive script that appears to be the initials 'AT' followed by a flourish.