

Kraków, 06.02.2024 r.

dr hab. Renata Kopeć, prof. IFJ PAN
Instytut Fizyki Jądrowej PAN
ul. Radzikowskiego 152
31-342 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Adrianny Tartas

p.t.

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

Ze względu na szerokie zastosowanie promieniowania jonizującego, jego wpływ na organizmy żywe jest przedmiotem badań niemalże od czasu jego odkrycia. Uszkodzenia indukowane przez promieniowanie jonizujące zależą od szeregu czynników, w tym głównie od rodzaju promieniowania, dawki i materiału biologicznego. Z tego względu mechanizmy oddziaływania i naprawy uszkodzeń DNA w materiale biologicznym różnego pochodzenia są przedmiotem badań naukowców na całym świecie. Rozprawa doktorska Pani mgr Adrianny Tartas dotyczy powyższych zagadnień. Praca powstała w Zakładzie Fizyki Biomedycznej Instytutu Fizyki Doświadczalnej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego w oparciu o wyniki badań radiobiologicznych "*in vitro*" przeprowadzonych w laboratorium Zakładu Biologii Molekularnej Uniwersytetu w Sztokholmie oraz "*in silico*" tj. symulacji komputerowych metodami Monte Carlo. Promotorami rozprawy są dr hab. Beata Brzozowska oraz dr hab. Jarosław Żygierewicz, prof. UW.

Rozprawa doktorska została podzielona na osiem rozdziałów. Rozdział pierwszy zawiera krótkie wprowadzenie do podjętej tematyki, cel pracy oraz wykaz publikacji Doktorantki. Rozdział drugi i trzeci zawierają wstęp teoretyczny. Rozdział drugi omawia rodzaje promieniowania jonizującego, jego oddziaływanie z materią, w szczególności z materiałem biologicznym, stosowane w pracy jednostki i pojęcia oraz opis mechanizmów uszkodzeń i naprawy DNA. Rozdział trzeci poświęcony jest opisowi badań radiobiologicznych oraz stosowanej terminologii. Dwa główne podrozdziały dotyczą technik wykorzystywanych

w pracy czyli badań „*in vitro*” (odnoszący się zwykle do badań w kontrolowanych warunkach z użyciem izolowanych komórek lub tkanek biologicznych w probówce) i „*in silico*” (czyli zastosowaniu algorytmów i danych do symulacji zjawisk biologicznych). W dwóch kolejnych rozdziałach Autorka opisuje zastosowane w pracy materiały i metody. W rozdziale czwartym znajduje się opis użytego materiału komórkowego oraz układów eksperymentalnych z zastosowaniem promieniowania α i promieniowania γ . Kolejne podrozdziały to opisy: procedur eksperymentalnych, sposobu analizy ognisk naprawczych obserwowanych pod mikroskopem fluorescencyjnym oraz analiza statystyczna. W szczególności istotne dla tej rozprawy doktorskiej w dyscyplinie nauki fizyczne, Autorka przedstawiła rozdział piąty poświęcony aspektom związanym z pomiarami dawek promieniowania jonizującego tak, aby można było precyzyjnie określić efekt biologiczny wywoływany narażeniem na promieniowanie jonizujące. Ze względu na zastosowanie różnych rodzajów promieniowania (promieniowania α oraz promieniowania γ) zastosowano różne metody pomiarowe takie jak: filmy radiochromowe, dozymetr krzemowy oraz modelowanie numeryczne - symulacje Monte Carlo. W rozdziale szóstym Autorka zaprezentowała badania sprawdzające odpowiedź komórek (z linii U2OS na promieniowanie jonizujące γ i α oraz na kombinację obu typów promieniowania) co pozwala na monitorowanie obszarów, w których powstały DSB w miarę upływu czasu przy użyciu ognisk naprawczych. W celu uzyskania zarówno danych ilościowych, jak i jakościowych dotyczących ognisk zawierających białko NBS1 wykonana została analiza obrazów z uwzględnieniem pomiaru liczby, rozmiaru oraz intensywności ognisk. W rozdziale siódmym wykonano analizę ruchów ognisk naprawczych i wskazano na ich podobieństwo do ruchów Browna. Co nietypowe dla rozpraw doktorskich w poszczególnych rozdziałach 5-7 przeprowadzono dyskusję oraz zaprezentowano wnioski. Natomiast ostatni (ósmy) rozdział pracy zawiera podsumowanie całej pracy w kontekście postawionych celów oraz wskazuje dalsze perspektywy dotyczące kierunków badań. Na końcu pracy znalazła się bibliografia oraz trzy dodatki zawierające materiały dotyczące pracy takie jak protokół oraz odwołanie do wyników badań.

Główny temat badań w ramach recenzowanej rozprawy doktorskiej dotyczył oceny oddziaływania promieniowania jonizującego o różnych wartościach LET na komórki nowotworowe mięsaka kościopochodnego (U2OS). Przedstawiona rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu naukowego i przyjętego celu badań. Analizowano komórki ekspozowane osobno oraz sekwencyjnie w różnej kolejności na cząstki α oraz promieniowanie γ . Uzyskane w ramach recenzowanej rozprawy doktorskiej wyniki

wskazują, iż odpowiedź komórkowa i mechanizmy naprawy będą zależeć od kolejności napromieniania komórek promieniowaniem jonizującym o niskim bądź wysokim LET. Zaobserwowano małą ruchliwość ognisk naprawczych po ekspozycji z zastosowaniem cząstek α jako pierwszych w porównaniu do odwrotnej kolejności podczas których komórki były najpierw ekspozowane na promieniowanie γ , wskazując, iż chromatyna odgrywa kluczową rolę w tej odpowiedzi. Autorka wskazuje, iż ze względów technicznych obserwacje były prowadzone w czasie 5 godzin po ekspozycji oraz w obrazach dwuwymiarowych wskazując jednocześnie dalsze kierunki badań, które mogłyby polegać na obserwacji ognisk naprawczych w dłuższym czasie bądź w 3D.

Praca jest napisana bardzo starannie pod względem edytorskim. Nie doszukałam się istotnych uchybień redakcyjnych, błędów w metodyce pracy i sposobie obliczania niepewności, które Autorka – co warto podkreślić - przedstawia w sposób staranny i dokładny. Układ pracy, choć nietypowy (jak wskazałam wyżej) jest poprawny. Przedstawiony spis publikacji oraz ich dyskusja pozwalają w sposób jasny i klarowny ocenić zakres pracy wykonanej przez Autorkę. Tak przygotowana rozprawa doktorska świadczy o ogólnej wiedzy teoretycznej doktorantki w zakresie nauk fizycznych, a także radiobiologicznych.

Nieliczne uwagi i zapytania przedstawiam poniżej:

- Czym kierowano się przy wyborze linii komórkowej U2OS? Nie jest to bowiem najpopularniejsza nowotworowa linia komórkowa stosowana w badaniach radiobiologicznych.
- W rozdziale 1 w kilku miejscach Autorka pisze o zastosowaniach medycznych promieniowania, w domyśle jonizującego. Ponieważ zastosowanie promieniowania - nie tylko jonizującego - jest szerokie warto byłoby zaznaczyć to rozróżnienie. Ta sama uwaga dotyczy opisu narażenia na naturalne promieniowanie (w domyśle jonizujące).
- W rozdziale 2 autorka używa w odniesieniu do promieniowania rentgenowskiego i γ sformułowania „cząstki”, odwołując się do opisu kwantowego. W kontekście całego rozdziału naturalniejsze - z mojego punktu widzenia - wydaje się określenie „promieniowanie fotonowe”, ponieważ opisane w rozdziale 2.2 oddziaływanie promieniowania z materią odnosi się do jedynie fotonów (co zresztą zostało zaznaczone i jest zrozumiałe ze względu na zakres pracy), niekoniecznie zaś do wszystkich cząstek neutralnych (w tym np. neutronów) - tak jak sugerowałaby to nazwa podrozdziału.

Ponadto takie podejście podkreśliłoby to różnice w sposobach utraty energii. W przypadku cząstek naładowanych jednostką opisującą straty energii jest zdolność hamowania - Autorka przytacza tutaj równanie Bethego-Blocha (równanie 2.1), nie ma natomiast - choć są opisane mechanizmy oddziaływań fotonów z materią - podsumowania w jaki sposób następuje utrata energii promieniowania fotonowego w nawiązaniu do współczynnika pochłaniania i prawa osłabienia ekponencjalnego. Bardzo pozytywnie oceniam opis w kolejnym rozdziale (2.3) wyjaśniający różnice w depozycji energii (gęstości jonizacji) dla promieniowania o wysokim i niskim LET.

- W tego typu badaniach niewystarczające mogą okazać się eksperymenty prowadzone z wykorzystaniem jednego typu linii komórkowej. Każda linia komórkowa (nawet tego samego typu nowotworu) może cechować się odmiennym podłożem genetycznym oraz zdolnością naprawy uszkodzeń popromiennych. Proszę zatem o wyjaśnienie czy uzyskane przez Autorkę wyniki mogą być odnoszone, korelowane (czy będą znamienne różne) dla innych linii komórkowych mięsaka kościopochodnego, a w konsekwencji pozostałych linii nowotworowych (np. gleju, prostaty, piersi).
- Podczas ekspozycji na promieniowanie istotne są także badania odpowiedzi komórek prawidłowych np. fibroblastów. Krótkiej dyskusji wymaga odniesienie uzyskanych danych dla tego typu komórek.
- Na części rysunków brakuje jednostek i zakresów, co ułatwiłoby analizę (np. rysunki 2.13 oraz 3.1).
- Opisy na temat "kombinacji napromieniania" są niejasne, m.in. nie do końca jest jasne czego dotyczą: czasów napromieniania czy dawek? W rozdziale 4.2.1 Doktorantka pisze o porównywalnych czasach napromieniania - co nie ma istotnego znaczenia ponieważ czasy nie odpowiadają dawkom od promieniowania X w stosunku 1:1. Dawki będą zależeć od energii promieniowania, użytej filtracji, udziałowi promieniowania miękkiego w widmie rentgenowskim. W opisach w rozdziale 4.3.7 i rozdziale 6 występują rozbieżności w opisie kombinacji napromieniania: na stronie 35 podano, iż napromieniano w kombinacji 45% promieniowania α i 55% promieniowania γ , natomiast na początku rozdziału 6 Autorka podaje proporcje 46% promieniowania γ i 54% promieniowania α . Czy istotnie nieznacznie zmieniono czas napromieniania?

Rozprawa doktorska Pani Adrianny Tartas dotyczy zagadnień istotnych dla zrozumienia mechanizmów oddziaływania promieniowania jonizującego z materiałem biologicznym. Przedstawione wyniki mogą mieć szerokie znaczenie, istotne zarówno podczas takich zastosowań w medycynie jak radioterapia i wpływ wytworzonych mieszanych pól promieniowania, jak również w przypadku narażenia np. na promieniowanie kosmiczne astronautów podczas lotów załogowych. Przedstawione badania „*in vitro*” stanowią podstawę do dalszych rozważań i pozwalają dokładniej (na poziomie komórkowym) przyjrzeć się zachodzącym mechanizmom powstawania uszkodzeń DNA, następnie zachodzącym procesom naprawczym. Doktorantka w pełni zrealizowała cele postawione w pracy. Pozytywnie oceniam wartość przedstawionej rozprawy doktorskiej, a przedstawione powyżej pytania i komentarze nie wpływają negatywnie na warstwę merytoryczną przedstawionej rozprawy.

Chciałabym zaznaczyć, że przedstawiona rozprawa doktorska wyróżnia się pod względem zakresu podjętej tematyki, gdyż przedstawione zagadnienia są szczególnie wymagające, ze względu na stopień skomplikowania i konieczności zastosowania różnych technik, w tym numerycznych. Konkludując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Adrianny Tartas spełnia wszelkie wymagania stawiane dysertacjom na stopień doktora i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani Adrianny Tartas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Renata Kopeć, prof. IFJ PAN