

prof. dr hab. Konrad Czerski
Instytut Fizyki
Wydział Matematyczno-Fizyczny
Uniwersytet Szczeciński
ul. Wielkopolska 15
70-451 Szczecin

Dziekanat Wydziału Fizyki UW
Seksja ds. pracowniczych
Wpłynęło dat: 29.01.2016
podpisaf.....

Recenzja rozprawy doktorskiej
„Dawka lokalna i jej rola w biologicznej odpowiedzi linii komórkowych ssaków *in vitro*”
pani mgr Urszuli Kaźmierczak

Tematem pracy pani mgr Kaźmierczak jest badanie odpowiedzi biologicznej komórek chomika chińskiego (CHO-K1) poddanym naświetlaniu promieniowaniem rentgenowskim i jonów ^{12}C przy stosunkowo niskich energiach, charakteryzujących się dużą gęstością jonizacji. Głównym celem przeprowadzonych eksperymentów było poszukiwanie jednoznacznej sygnatury efektu sąsiedztwa (ang. bystander effect). Polega on na indukcji popromiennej odpowiedzi biologicznej w komórkach nieeksponowanych na promieniowanie, a jedynie przebywających w sąsiedztwie komórek napromieniowanych. Efekt ten był badany w przeszłości przez wiele grup badawczych przy użyciu różnego rodzaju promieniowania jonizującego i różnych technik eksperymentalnych, prowadząc do niejednoznacznych, często nawet sprzecznych rezultatów. Brak powtarzalności eksperymentów wynika prawdopodobnie z nieznaności mechanizmów odpowiedzialnych za ten efekt. Najczęściej przyjmuje się, że sygnały naświetlonych komórek przesyłane są drogą połączeń szczelinowych za pośrednictwem cytokin lub innych czynników sygnałowych wydzielanych do otoczenia, indukujących w komórkach sąsiednich uszkodzenia DNA i prowadzących do ich apoptozy. Z dotychczasowych obserwacji wynika, że efekt sąsiedztwa zależy od zaabsorbowanej dawki i od stosunku liczby komórek napromieniowanych do nienapromieniowanych. Ponadto stosowane są układy pomiarowe, które umożliwiają bezpośredni kontakt fizyczny między komórkami bądź takie, w których kontakt ten zapewniony jest pośrednio poprzez hodowlę we wspólnym medium hodowlanym.

W pracy pani Kaźmierczak zdecydowano się na wykorzystanie tej drugiej metody, wykorzystując specjalnie skonstruowane naczynia do wspólnej hodowli komórek, zapewniając jednocześnie brak bezpośredniego kontaktu komórek napromieniowanych i nienapromieniowanych. Biologiczną odpowiedź analizowano przy wykorzystaniu testu mikrojądrowego oraz badając zdolność kolonii komórkowych do klonowania, określając tym

samym ich przeżywalność. Ze względu na bardzo duże zróżnicowanie wyników różnych grup badawczych szczególną uwagę zwrócono na dozymetryczną stronę eksperymentów, badając natężenie i jednorodność wiązki jonów ^{12}C za pomocą metod fizycznych i biologicznych.

Potwierdzenie i poznanie mechanizmów efektu sąsiedztwa mogłoby mieć istotny wpływ na praktykę kliniczną stosowaną w radioterapii zmian nowotworowych. Konsekwencje efektu sąsiedztwa mogą mieć charakter zarówno korzystny jak i niekorzystny. Z jednej strony efekt ten mógłby zwiększyć efektywność radioterapii poprzez indukcję uszkodzeń w komórkach nowotworowych znajdujących się poza obszarem naświetlanym, ale z drugiej mógłby być odpowiedzialny za zwiększenie powikłań popromiennych w tkankach żywych. Stąd temat pracy ma walory nie tylko poznawcze, ale także aplikacyjne.

Rozprawa doktorska liczy 134 stron i jest podzielona na sześć rozdziałów, które poniżej pokrótce omówię.

Pierwszy rozdział jest poświęcony opisowi oddziaływania promieniowania jonizującego z materią i wprowadza pojęcia fizyczne, które w dalszej części rozprawy będą stanowić podstawę planowania eksperymentów i dyskusji ich wyników. Przedstawione są zależności zdolności hamowania cząstek naładowanych oraz liniowego przekazu energii, co stanowi podstawę do obliczenia rozkładu dawki w zależności od głębokości obiektu naświetlanego. Tutaj wkradła się pewna nieścisłość, gdyż przytoczony wzór Bethego-Blocha (1.1) opisuje tylko zdolność hamowania dla stosunkowo wysokich energii potrzebnych do jonizacji ośrodka. Stąd nie jest on w stanie opisać przebiegu tej zależności w obszarze, gdzie także procesy wzbudzenia atomu są ważne, a więc dla energii w pobliżu maksimum zdolności hamowania i poniżej jego. W dalszym ciągu rozdziału zaprezentowano koncepcję dawki lokalnej i jej związku rozkładem szybkich elektronów powstałych w procesie jonizacji.

W następnym rozdziale autorka zajmuje się biologicznymi skutkami promieniowania jonizującego prezentując podstawowe pojęcia i mechanizmy biologiczne na poziomie komórkowym oraz sposoby ich badania jak np. aberracje chromosomowe, mikrojądra komórkowe czy też przeżywalność komórek. Przedstawiono także koncepcję efektu sąsiedztwa, metody badawcze i prawdopodobne jego mechanizmy.

Po tym ogólnym wstępie w rozdziale trzecim mgr Kaźmierczak sformułowała krótko cele przedłożonej pracy, aby w następnych rozdziałach opisać już metodykę własnych badań i otrzymane rezultaty. Jak już wspominałem powyżej, ze względu na trudności w powtarzalności eksperymentów szczególny nacisk położono na precyzyjne określenie wszystkich ważnych parametrów przeprowadzonych doświadczeń, co zostało wyczerpująco przedstawione w rozdziale czwartym. Tutaj jednym z najważniejszych elementów był sam układ eksperymentalny do naświetlań jonami ^{12}C w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów

Uniwersytetu Warszawskiego i sposoby badania rozkładu natężenia oraz dozymetrii promieniowania. W tym celu wykonano badania z wykorzystaniem metod fizycznych (użycie folii samo wywołującej i dielektrycznych detektorów śladowych) jak również biologicznego testu γ -H2AX. Wykonane testy, przedstawione w rozdziale piątym, potwierdziły z dużą precyzją prawidłowe funkcjonowanie systemu dozymetrycznego wykorzystanego w układzie badawczym. Eksperymenty z użyciem źródła promieniowania rentgenowskiego (prawdopodobnie firmy YXLON a nie jak podano w pracy XYLON) przeprowadzono w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. Zabrakło natomiast przedstawienia informacji na temat widma energetycznego tego źródła i liniowego przekazu energii. W rozdziale piątym przedstawiono również wyniki ilościowej analizy występowania mikrojąder w komórkach CHO-K1 dla trzech dawek promieniowania 0,1 Gy, 1 Gy i 4Gy. Analiza ta stanowiła podstawę dla badania popromiennego efektu sąsiedztwa za pomocą zarówno testu mikrojądrowego jak i testu klonogenego. Przeprowadzono je również dla trzech dawek i dwóch rodzajów promieniowania: jonów ^{12}C i promieniowania rentgenowskiego.

W rozdziale szóstym mgr Kaźmierczak podsumowała otrzymane wyniki i porównała z rezultatami badań innych autorów, zaś w rozdziale siódmym przedstawiła ostateczne wnioski, podkreślając, że analiza statystyczna wskazuje na brak efektu sąsiedztwa w badanym układzie eksperymentalnym. Ze względu na duże znaczenie badanych efektów negatywny wynik stanowi jednak w moim przekonaniu przede wszystkim motywację do dalszych badań w tej dziedzinie.

Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo duża staranność w przygotowaniu przedstawionej dysertacji, logiczny i wyczerpujący układ pracy, co współgra z bardzo starannie i precyzyjnie wykonanymi doświadczeniami. Natomiast moje główne zastrzeżenia do recenzowanej pracy odnoszą się do sposobu analizy danych eksperymentalnych. Autorka przedstawiła w większości przypadków otrzymane rezultaty w formie tabel i diagramów słupkowych, pomijając zbadanie ich liniowości bądź nieliniowości w zależności od zastosowanej dawki. Skąd inąd wiadomo oczywiście, że właśnie zależność funkcyjna może dostarczyć cennych informacji. Wydaje się, że cztery punkty pomiarowe, włączając w to dane otrzymane bez promieniowania, jest wystarczającą liczbą, aby sprawdzić ich liniowość.

Oto kilka przykładów. W tabeli 5.1 na str. 71 podano liczbę śladów zarejestrowanych w detektorze PM-355 i oczekiwaną liczbę jonów. Obie wielkości powinny być liniowe w funkcji dawki, co należałoby sprawdzić. Podobnie tabela 5.2 przedstawia liczbę ognisk γ -H2AX w zależności od dawki. Ponieważ ogniska te odpowiadają liczbie podwójnych złamań helisy DNA, badana zależność powinna być liniowa. Tymczasem można prawdopodobnie stwierdzić silną nieliniowość – dlaczego? W tabelach 5.5 i 5.6 przedstawione są wyniki liczbowe testów mikrojądrowych, i tutaj także można by sprawdzić liniowość otrzymanych zależności – wydaje

się że liczba mikrojąder w próbkach naświetlonych jonami ^{12}C rośnie zbyt wolno ze wzrastającą dawką.

Inna moja uwaga odnosi się do analizy danych poddanych testowi U (tabela 5.7 i 5.8). Niestety w pracy nie podano wyrażenia na funkcję U i nie określono niepewności z jaką został wyznaczony odpowiedni parametr. Stąd stwierdzenia o zgodności z rozkładem Poissona bądź jej braku mają tylko ograniczoną wartość. Z drugiej strony wyniki otrzymane dla jonów węgla potwierdzają tzw. overdispersion, co jest charakterystyczne dla cząstek o wysokim liniowym przekazywaniu energii i opisywane jest rozkładem typu Neuman A.

Na koniec chciałbym się odnieść do wyników otrzymanych w teście klonogennym. Podczas gdy przeżywalność komórek sąsiednich do komórek naświetlonych jonami węgla rzeczywiście nie wskazuje na efekt sąsiedztwa, to w przypadku promieniowania rentgenowskiego (tabela 5.10) przeżywalności obliczone dla wszystkich dawek promieniowania są systematycznie mniejsze niż jeden. Jeżeli uśrednić wszystkie sześć zmierzonych wielkości (można to zrobić bo błędy się pokrywają), wówczas otrzymana wartość średnia obciążona będzie znacznie mniejszym błędem tak, że wynik staje się statystycznie znaczący na poziomie ufności wyższym niż 95%. Dokładne obliczenia można wykonać używając testu t i określić wartość p (p-value). Podobne obliczenia można by także wykonać tylko dla czterech punktów pomiarowych otrzymanych dla wyższych dawek, dla których oczekujemy saturacji efektu sąsiedztwa.

Powyższe uwagi nie zmieniają mojej bardzo dobrej opinii o recenzowanej pracy. Stanowią jedynie przyczynek do dyskusji otrzymanych wyników.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Urszuli Kaźmierczak stanowi oryginalne podejście do badania popromiennego efektu sąsiedztwa w komórkach CHO-K1 przy wykorzystaniu wiązki jonów ^{12}C i promieniowania rentgenowskiego. Pomimo negatywnego wyniku końcowego, badania te stanowią podstawę do dalszych analiz i eksperymentów. Pani Kaźmierczak wykazała się ogólną wiedzą fizyczną i biologiczną oraz zdolnościami eksperymentalnymi, udowadniając, że jest przygotowana do prowadzenia samodzielnych badań naukowych. Uważam, że rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony.

prof. dr hab. Konrad Czerski

DYREKTOR
Instytutu Fizyki

prof. dr hab. Zbigniew Czerski