

Warszawa, 16 stycznia 2024 rok

Prof. dr hab. Anna Lankoff
Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16
03-195 Warszawa
e-mail: a.lankoff@ichtj.waw.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Adrianny Tartas

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

Recenzja została wykonana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne, Pana prof. dr hab. Wojciecha Satułę, z dnia 5 grudnia 2023 roku (pismo nr BRN-XII/531/87/2023), w związku z decyzją Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego, na mocy której zostałam powołana na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr Adrianny Tartas.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Adrianny Tartas została wykonana w Zakładzie Fizyki Biomedycznej w Instytucie Fizyki Doświadczalnej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, pod kierunkiem Pani dr hab. Beaty Brzozowskiej oraz Pana dr hab. Jarosława Żygierewicza, prof. UW. Rozprawa jest 100-stronicowym dziełem, poprzedzonym streszczeniem rozprawy w języku polskim i angielskim oraz wykazem skrótów. Pierwszy rozdział rozprawy stanowi wprowadzenie czytelnika w tematykę badań, motywację przeprowadzenia zaplanowanych eksperymentów oraz określenie znaczenia otrzymanych wyników w dziedzinie fizyki medycznej. Rozdział ten zawiera również spis publikacji doktorantki, z podziałem na te, które obejmujące wyniki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej (4 publikacje z listy JCR) oraz na te, które nie dotyczą bezpośrednio zagadnień prezentowanych w rozprawie (4 publikacje z listy JCR). Kolejne dwa rozdziały, obejmujące 25 stron, stanowią wstęp teoretyczny rozprawy. Zostały w nim omówione podstawy oddziaływania promieniowania jonizującego z materiałem biologicznym (m.in. parametry i wielkości służące do opisu jakości i efektywności promieniowania w kontekście indukcji uszkodzeń DNA, a także mechanizmy naprawy DNA) oraz wybrane testy radiobiologiczne, które wykorzystywane są w badaniach oddziaływania promieniowania jonizującego z materiałem biologicznym, ze szczególnym uwzględnieniem testów istotnych w kontekście rozprawy doktorskiej. Kolejny rozdział, liczący 10 stron, obejmuje opis materiałów i metod zastosowanych w eksperymentach radiobiologicznych oraz opis układu doświadczalnego. Teoretyczna i doświadczalna weryfikacja dozymetryczna zastosowanych źródeł promieniowania jonizującego zostały opisane szczegółowo w rozdziale piątym (11

stron). W kolejnych dwóch rozdziałach, liczących 18 stron, Doktorantka przedstawiła i omówiła zagadnienia związane z powstawaniem i zanikaniem popromiennych ognisk naprawczych w jądrach komórkowych, ze szczególnym uwzględnieniem liczby ognisk, ich rozmiaru, intensywności oraz mobilności. Ostatni, siódmy rozdział (22 strony) zawiera wnioski, które stanowią odpowiedzi na pytania postawione w ramach celu rozprawy, a także sugestie dotyczące ewentualnych kierunków rozszerzenia badań w przyszłości. Rozprawa zawiera również bibliografię, protokół laboratoryjny hodowli komórek U2OS oraz informacje na temat dostępu do wybranych danych eksperymentalnych, które zostały umieszczone na stronach internetowych.

Celem niniejszej rozprawy było zbadanie wpływu sekwencyjnego napromieniania komórek na dynamikę powstawania i zanikania ognisk naprawczych w DNA. Problem badawczy jest bardzo ciekawy z poznawczego punktu widzenia, ponieważ pomimo wielu lat badań, nadal nie ma jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, jakie są biologiczne efekty narażenia materiału genetycznego na działanie mieszanych, a szczególnie sekwencyjnych efektów działania różnych typów promieniowania jonizującego, które oddziałują jednocześnie lub w krótkich odstępach czasu. Problem ten jest również bardzo interesujący z praktycznego punktu widzenia, gdyż jest on ściśle związany z ochroną radiologiczną i radioterapią.

Doktorantka podeszła do problemu badawczego kompleksowo. W pierwszej, fizycznej części badań, skupiła się na teoretycznej i doświadczalnej dozymetrii stosowanych źródeł promieniowania, mającej na celu dokładne określenie dawki, jaką otrzymuje materiał biologiczny. Do oszacowania energii zdeponowanej i liczby cząstek α , które oddziałują z atomami jądra komórkowego oraz do oszacowania rozkładu dawki i wartości LET, poziomu niejednorodności dawki i niepewności w różnych układach eksperymentalnych, Doktorantka wykonała teoretyczne symulacje z wykorzystaniem dwóch kodów Monte Carlo (PARTRAC i Geant4). W celu sprawdzenia jednorodności promieniowania γ Doktorantka przeprowadziła dozymetrię z wykorzystaniem metod fizycznych (film radiochromowy EBT3 Gafchromic oraz krzemowy dozymetr aktywny). Uzyskane wyniki wykazały jednorodny rozkład zdeponowanej energii, jednorodny rozkład liczby torów cząstek α i wąski rozkład wartości LET z ^{241}Am oraz potwierdziły wartość mocy dawki, którą można uzyskać ze źródła ^{137}Cs oraz zadowalającą jednorodność dawki w komorze. Szczegółowa charakterystyka źródeł promieniowania pozwoliła Doktorantce na przeprowadzenie drugiej, radiobiologicznej części badań.

Badania radiobiologiczne skupiły się na poznaniu wpływu sekwencyjnego napromieniania komórek cząstkami α i promieniowaniem γ na ogniska naprawy DNA, zawierające białko nibrynę (NBS1). Materiał do badań stanowiły komórki z linii U2O2, wyprowadzonej z komórek mięsaka kościopochodnego. Komórki były trwale transfekowane plazmidem kodującym białko zielonej fluorescencji (GFP). Zastosowanie ww. komórek umożliwiło Doktorantce długotrwałe obrazowanie (300 minut) w czasie rzeczywistym żywych komórek, w których tworzą się i zanikają ogniska naprawy DNA. Komórki były napromieniane według czterech scenariuszy: (I) napromieniane cząstkami α , (II) napromieniane promieniowaniem γ , (III) napromieniane sekwencyjnie promieniowaniem γ po cząstkach α i (IV) napromienianie sekwencyjnie cząstkami α po promieniowaniu γ . Dawki,

które zostały zastosowane do napromieniania komórek to 1,7 Gy dla cząstek α , 2 Gy dla promieniowania γ i 1,85 Gy dla sekwencyjnego napromieniania γ po α i α po γ .

Pierwszy etap badań radiobiologicznych dotyczył analizy kinetyki powstawania i zanikania ognisk naprawczych NBS 1. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę potwierdziły dane literaturowe, wskazujące na znaczny i zależny od dawki promieniowania wzrost liczby popromiennych ognisk naprawy DNA. Wyniki potwierdziły również dane literaturowe, które wskazują, że liczba ognisk stopniowo spada w miarę upływu czasu naprawy. Dosyć oczekiwanym wynikiem była również największa liczba ognisk naprawczych w komórkach poddanych działaniu promieniowania γ i najmniejsza w komórkach napromienionych cząstkami α . Szczególnie ciekawe i oryginalne są wyniki dotyczące napromieniania sekwencyjnego. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę wykazały, że chociaż obie sekwencje napromieniania wywoływały początkowo wysoką liczbę ognisk, jednak synergia między promieniowaniem γ a promieniowaniem α pod względem opóźnionej naprawy wystąpiła jedynie w przypadku sekwencyjnego napromieniania $\alpha \rightarrow \gamma$. W przypadku sekwencyjnego napromieniania $\gamma \rightarrow \alpha$ Doktorantka zaobserwowała szybką naprawę, a liczba ognisk spadła poniżej oczekiwanej wartości, osiągając prawie poziom ognisk wywołanych przez cząstki α .

Drugi etap badań radiobiologicznych obejmował analizę wielkości ognisk. Doktorantka słusznie założyła, że wielkość ogniska powinna być wprost proporcjonalna do złożoności uszkodzeń DNA, zatem powinna być większa w jądrach komórkowych poddanych działaniu promieniowania α , w porównaniu z promieniowaniem γ . Zgodnie z oczekiwaniami Doktorantki, największe ogniska były obserwowane zaraz po ekspozycji na cząstki α , a ich wielkość zmniejszała się w miarę upływu czasu. Promieniowanie γ indukowało na początku małe ogniska, których wielkość nie zmieniała się znacząco przez pierwsze 180 minut obserwacji. Moją największą ciekawość wzbudziły wyniki, które dotyczyły napromieniania sekwencyjnego. Wykazały one, że sekwencyjne napromienianie $\gamma \rightarrow \alpha$ indukowało na początku małe ogniska, których wielkość nie zmieniała się znacząco przez pierwsze 180 minut obserwacji. Po tym czasie Doktorantka obserwowała jednak lekki wzrost wielkości ognisk. Ogniska, które powstały w wyniku ekspozycji komórek na sekwencyjne napromienianie $\alpha \rightarrow \gamma$ były na początku mniejsze niż te, które powstały po ekspozycji tylko na cząstki α . Jednak od 150. minuty po ekspozycji średnia wielkość ognisk zaczęła stopniowo wzrastać, osiągając maksimum po 270 minutach od czasu rozpoczęcie napromieniania i była największa spośród wszystkich przeprowadzonych eksperymentów.

Kolejną charakterystyką ognisk naprawczych, na której skupiła się Doktorantka, była intensywność fluorescencji ognisk NBS1-GFP w jądrze komórkowym, będąca miarą całkowitej ilości białka naprawczego. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę wykazały, że największa całkowita intensywność ognisk została zaobserwowana w komórkach poddanych działaniu sekwencyjnego napromieniania $\alpha \rightarrow \gamma$. Najniższe wartości całkowitej intensywności ognisk zostały zaobserwowane dla sekwencyjnego napromieniania $\gamma \rightarrow \alpha$. Natomiast najbardziej wyraźny spadek całkowitej intensywności ognisk wystąpił dla komórek napromienionych cząstkami α .

Ostatnim, ciekawym etapem badań podjętych przez Doktorantkę była analiza mobilności ognisk naprawczych, generowanych przez pojedyncze jak i sekwencyjne napromienianie komórek. Uzyskane wyniki wykazały, że ogniska, które zostały indukowane

we wszystkich scenariuszach napromieniania, wykazywały subdyfuzyjny ruch w ograniczonej przestrzeni, co, jak zostało słusznie stwierdzone przez Doktorantkę, sugeruje, że środowisko chromatyny, na którą oddziałuje promieniowanie, ma dominujący wpływ na proces naprawy uszkodzeń DNA.

Podsumowując, wyniki pracy są bardzo ciekawe i spójne, wzbudzają wysoki stopień zaufania czytelnika i poszerzają w istotny sposób wiedzę na temat mechanizmów powstawania i zanikania ognisk naprawczych DNA NBS1. W mojej opinii zastosowanie sekwencyjnych dawek zamiast „mieszanej dawki” jest oryginalnym podejściem i zasługuje na największe docenienie, bowiem wynik jasno pokazuje, że kolejność napromienienia ma decydujący wpływ na efekt dawki mieszanej. Wybór białka naprawczego NBS1 przez Doktorantkę, zamiast najczęściej wybieranych białek 53BP1 oraz gamma-H2AX, również zasługuje na docenienie. Białko NBS1 jest komponentem kompleksu MRN, który bardzo wcześnie rozpoznaje podwójnoniciowe uszkodzenia DNA, organizując szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR). Zatem, dynamikę powstawania ognisk NBS1 można uznać za doskonały wyznacznik DDR.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam kilka uwag, które nie umniejszają wartości pracy i nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę:

1. Doktorantka przedstawiła wyłącznie cel główny rozprawy. Zabrakło mi przedstawienia celów szczegółowych, które porządkują kolejność etapów realizacji pracy i finalnie przyczyniają się do realizacji celu głównego.
2. Na stronie 34 w podrozdziale 2.7.2 brakło mi schematu szlaku naprawy DNA, który pokazywałby w przejrzysty sposób umiejscowienie białka NBS1 w tym szlaku.
3. Na stronie 39 Doktorantka napisała, że „Ogniska zawierające białko naprawcze poruszają się wewnątrz komórek”. Po pierwsze, ogniska zawierające białko naprawcze nie poruszają się wewnątrz komórek, a wewnątrz jądra komórkowego. Po drugie, obserwowana przez Doktorantkę zmiana położenia ogniska naprawczego nie wynika z jego niezależnego ruchu, ale z ruchu domeny chromatyny, która zawiera ognisko naprawcze w miejscu podwójnoniciowego pęknięcia DNA. Ta uwaga odnosi się do całego rozdziału 7, zatytułowanego jako „Mobilność ognisk naprawczych”. W mojej opinii bardziej odpowiednim tytułem dla tego rozdziału powinien być tytuł: „Mobilność chromatyny zawierającej ogniska naprawcze”.
4. Na stronie 46, podrozdział 4.3.1 Napromienianie sekwencyjnymi wiązkami mieszanymi Doktorantka napisała, że dawki, które zostały użyte do napromieniania to odpowiednio 1,7 Gy, 2 Gy oraz 1,85 Gy dla scenariuszy: (I) napromieniane cząstkami α , (II) napromieniane promieniowaniem γ , (III i IV) napromienianie wiązkami mieszanymi: γ po α i α po γ . Zabrakło mi informacji, dlaczego Doktorantka zdecydowała się na taki wybór dawek.
5. Na stronie 69 Doktorantka napisała, że „Wyniki przeprowadzonych badań nad mobilnością ognisk naprawczych wykazały subdyfuzyjny ruch nośników uszkodzeń DSB w ograniczonej przestrzeni”. O jakich nośnikach tu mowa ?
6. Na stronie 70 Doktorantka napisała, że „...ruchliwość chromatyny jest najwyższa w obszarach zawierających bardzo złożone uszkodzenia DNA. To może być wynikiem

rozpuszczania architektury chromatyny wzdłuż ścieżek cząstek o wysokim LET...". Co Doktorantka miała na myśli, pisząc o „rozpuszczaniu architektury chromatyny” ?

7. Opisy wykresów nie są zbyt informatywne i zmuszają czytelnika do przeszukiwania całej rozprawy w celu znalezienia istotnych danych, jak np. informacji na temat zastosowanych dawek promieniowania.
8. Szkoda, że Doktorantka skupiając się na analizie ognisk NBS1, nie uwzględniła w swoich badaniach przeżywalności komórek po zastosowaniu napromieniania sekwencyjnego. Taka analiza pokazałaby w sposób bardziej kompleksowy, czy i jak obserwowane różnice w kinetyce powstawania i zanikania ogniska NBS1 mogą wpływać na indukowaną promieniowaniem śmierć komórek.

Oceniając całość recenzowanej rozprawy Pani mgr Adrianny Tartas, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedmiot rozprawy doktorskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Uzyskane wyniki wnoszą istotny wkład do osiągnięć naukowych w Polsce i na świecie, o czym świadczy między innymi publikacja uzyskanych przez Doktorantkę wyników badań w 4 renomowanych czasopismach z listy JCR (PLOS One, International Journal of Radiation Biology, Radiation and Environmental Biophysics, Frontiers in Physics). Rozprawa jest świadectwem ogromnej pracowitości Doktorantki i bardzo dobrej znajomości podjętego tematu. Cel pracy został sprecyzowany jasno i konkretnie. Opis eksperymentów jest wystarczająco szczegółowy, aby można było ocenić stronę doświadczalną i dobrze zilustrowany. Literatura przedmiotu jest bardzo dobrze dobrana. Doktorantka wybrała 215 pozycji, nie ograniczając się do prac najnowszych. Język pracy jest poprawny, a zakres przeprowadzonych badań oraz dyskusja i wnioski przedstawione są klarownie. Zarówno zawartość merytoryczna rozprawy, jak i sposób analizy wyników oraz ich dyskusji pokazują umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę i świadczą o bardzo dużej dojrzałości naukowej oraz doskonałym warsztacie badawczym.

Biorąc powyższe pod uwagę, recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki zawarte w § 21 pkt 2–4 Załącznika nr 1 do uchwały nr 157 Senatu Uniwersytetu Warszawskiego z dnia 29 czerwca 2022 r. w sprawie określenia sposobu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora oraz stopnia doktora habilitowanego na Uniwersytecie Warszawskim, pozwalając w pełni na pozytywną konkluzję. Rozprawa doktorska spełnia warunki/wymagania określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. 2022 poz. 574 z późn. zmianami), dlatego wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Adrianny Tartas do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki fizyczne.

