

dr hab. inż. Ewelina Lipiec, prof. UJ
Instytut Fizyki
Zakład Fizyki Nanostruktur i Nanotechnologii
ul. Łojasiewicza 11, 30-348 Kraków
Ewelina.Lipiec@uj.edu.pl
+48 12 664 45 85



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział

Fizyki

Astronomii

i Informatyki

Stosowanej

Kraków 18 listopada 2024

Recenzja Pracy Doktorskiej

Wielkości nanodozymetryczne w analizie skutków napromieniania komórek V79 lekkimi jonami

wykonanej przez mgr Monikę Mietelską
pod kierunkiem dr hab. Beaty Brzozowskiej oraz dr Marcina Pietrzaka

Zakład Fizyki Biomedycznej Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział
Fizyki, Uniwersytet Warszawski

Od ponad 100 lat (odkrycie promieniowania X przez Wilhelma C. von Roentgena w 1895 roku) naukowcy badają i opisują oddziaływanie promieniowania jonizującego z materią żywą. Wyniki eksperymentów laboratoryjnych oraz monitorowanie populacji narażonych na duże dawki promieniowania w wyniku katastrof elektrowni jądrowych czy wybuchów bomb atomowych dostarczyły wielu cennych informacji o makroskopowych efektach wywołanych przez duże dawki promieniowania. Wiedza dotycząca mechanizmów fizycznych, chemicznych i biologicznych na poziomie pojedynczych makromolekuł (np.: podwójnej helisy DNA), które leżą u podstaw obserwowanych efektów makroskopowych, jest wciąż niekompletna i wymaga dalszych badań obejmujących zarówno prace eksperymentalne jak i obliczenia teoretyczne. Potrzebny jest uniwersalny opis interakcji pomiędzy promieniowaniem a głównym targetem radioterapii czyli DNA. Opis ten powinien bazować na wykorzystaniu wielkości fizycznych pozwalających na precyzyjną charakterystykę ilościową i jakościową skuteczności biologicznej promieniowania w nanoskali.

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Mietelskiej wpisuje się w ten bardzo ważny kierunek badaczy, wnikliwie analizując możliwości powiązania nanodozymetrycznych wielkości używanych w charakterystyce struktury toru cząstki jonizującej z odpowiedzią komórek na napromienianie. W niniejszej pracy doktorskiej Pani Monika Mietelska podejmuje się osiągnięcia bardzo trudnego i ambitnego celu badawczego, a mianowicie

ul. prof. Stanisława

Łojasiewicza 11

PL 30-348 Kraków

tel. +48(12) 664-48-90

fax +48(12) 664-49-05

e-mail:

wydzial.fais@uj.edu.pl

wykorzystania wielkości nanodozymetrycznych w ocenie biologicznej skuteczności lekkich jonów dla charakterystyki oddziaływania promieniowania jonizującego na żywe komórki.

OGÓLNA OCENA ROZPRAWY

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Mietelskiej została podzielona na 6 części, które stanowią spójną całość: i) wstęp, ii) podstawy teoretyczne, iii) opis materiałów i metod za pomocą których otrzymano dane nanodozymetryczne, iv) opis wykorzystywanych danych radiobiologicznych, v) wyniki i dyskusja oraz vi) podsumowanie i perspektywy.

Rozprawę rozpoczyna streszczenie, w którym dwukrotnie został ujęty cel badań: „weryfikacja możliwości zastosowania parametrów opisujących stochastyczne oddziaływania w nanoskali do określenia skuteczności lekkich jonów w radioterapii” oraz „wskazanie możliwości alternatywnego opisu oddziaływania promieniowania jonizującego z materiałem komórkowym w oparciu o wielkości mierzone w nanoskali”. Nie ma natomiast, ani w streszczeniu ani w pozostałych częściach rozprawy postawionej głównej hipotezy badawczej, która była testowana w ramach tej pracy doktorskiej. Autorka w streszczeniu pisze, iż w ramach prac badawczych „rozpatrzono hipotezę o związku między wielkościami nanodozymetrycznymi a opisem radiobiologicznym dla standardowego targetu jako modelu podstawowej jednostki DNA czulej na promieniowanie jonizujące”, ale nie do końca wiadomo czy to jest główna hipoteza testowana w rozprawie. Zasadność podjęcia tematyki badawczej, która przedstawiona jest we wstępie, nie budzi najmniejszych wątpliwości, a systematyczność i dokładność przedstawienia podstaw teoretycznych, dotychczasowych osiągnięć w dziedzinie i wykonanych badań pozwala czytelnikowi na samodzielne zaproponowanie hipotezy. Mimo tego, wg mojej opinii, sformułowanie hipotezy badawczej i napisanie jej przez Autorkę stanowiłoby wartość dodaną w tej pracy.

Koleją część stanowi kompleksowy, szczegółowy i systematyczny, a mimo to zwięzły opis podstaw teoretycznych oddziaływania promieniowania jonizującego na materię żywą. Pani mgr Monika Mietelska przytacza również dotychczasowe osiągnięcia naukowe w zakresie badań radiacyjnych, dozymetrii i nanodozymetrii. Przedstawione są definicje, wielkości i parametry, które zostały zdefiniowane i są wyliczane w celu ilościowej i jakościowej charakterystyki promieniowania oraz oddziaływania promieniowania na makromolekuły o znaczeniu biologicznym. Opisana jest także charakterystyka odpowiedzi komórkowej na napromienianie. W tej części pracy Autorka opisuje zarówno podejście makroskopowe jak i podejście statystyczne w nanoskali oraz przytacza wszystkie pojęcia i definicje wykorzystywane w kolejnych rozdziałach. W mojej opinii jest to bardzo wartościowa część pracy, stanowiąca kompendium wiedzy, które może być wykorzystywane zarówno przez osoby rozpoczynające badania naukowe

w zakresie radiobiologii i fizyki radiacyjnej jak i doświadczonych badaczy. Dość zwięzłe ale dokładne opisy świadczą o tym iż Autorka posiada szeroką wiedzę i doświadczenie oraz o dogłębnym zrozumieniu podjętej tematyki badawczej.

Rozdział 3 rozprawy doktorskiej obejmuje opis materiałów i metod, które zostały zastosowane aby otrzymać dane nanodozymetryczne. Dokładnie opisane zostały eksperymenty z wykorzystaniem Jet Counter (JC) i symulacje MC. Na Świecie istnieje zaledwie kilka gazowych systemów detekcyjnych, które są wykorzystywane do analizy torów cząstek jonizujących. Zastosowanie JC w ramach badań opisanych w niniejszej rozprawie jest jednym z czynników stanowiących o jej unikatowości.

Niniejsza praca stanowi bardzo wartościowy przykład wykorzystania danych zebranych przez innych badaczy. Analizowany zestaw danych eksperymentalnych jest bardzo obszerny zawiera bowiem aż 152 krzywe przeżywalności pochodzące z 30 artykułów naukowych otrzymanych w latach 1972–2017. Takie podejście pozwala na analizę znacznie większej ilości danych eksperymentalnych niż w przypadku kiedy eksperymenty byłyby prowadzone w ramach doktoratu, dodatkowo umożliwia wyeliminowanie czynników, które mogłyby mieć wpływ na wyniki gdyby eksperymenty radiobiologiczne były wykonywane tylko w jednym laboratorium (jak protokoły hodowli komórkowych, procedury laboratoryjne czy dostęp do źródeł promieniowania). Analiza danych otrzymywanych na przełomie prawie 50 lat wymaga jednak szczególnego podejścia, wnikliwej analizy i odpowiedniej selekcji danych. W ramach rozprawy zaprezentowano takie podejście, przykładem jest tutaj weryfikacja LET i ponowne obliczenia na podstawie energii wiązek jonów lub cząstek ze źródeł. Należy również zauważyć, iż początkowo analiza opierała się na danych zamieszczonych w wersji 3.2 PIDE (Particle Irradiation Data Ensemble). Natomiast po tym jak wersja 3.4 PIDE została opublikowana, wykonano dodatkowe obliczenia w oparciu o dodane dane.

Rozdział 5 obejmuje wyniki i ich dyskusję. W rozdziale tym wnikliwie analizowane są zależności pomiędzy wielkościami nanodozymetrycznymi (wyznaczonymi na podstawie eksperymentów nanodozymetrycznych i obliczeń MC) a wielkościami i parametrami charakteryzującymi odpowiedź komórek linii V79 poddanych ekspozycji na różne wiązki lekkich jonów.

W części 5.3.1 zestawiono wyliczone wartości R_2 z wielkościami charakteryzującymi biologiczną odpowiedź komórki na napromienianie. Otrzymane dane potwierdziły zasadność zastosowania wielkości nanodozymetrycznych w opisie biologicznych skutków uszkodzeń radiacyjnych. W szczególności zademonstrowano proporcjonalność między R_2 i $\sigma_{5\%}$ (przekrojem czynnym na inaktywację wyrażającym prawdopodobieństwo uśmiercenia komórek). Bazując na wynikach symulacji

MC oraz danych radiobiologicznych (krzywe przeżywalności) pokazano, iż średni rozmiar klastra M1 może posłużyć jako alternatywa LET, ponieważ wielkość ta charakteryzuje nie tylko jakość promieniowania ale i wywołany efekt biologiczny niezależnie od rodzaju jonów wybranych do napromienienia. Zademonstrowano, iż przebieg krzywej R2/M1 w funkcji M1, jest tożsamy z krzywą RBE(LET). Wszystkie rozważane zależności pomiędzy są poparte adekwatną analizą statystyczną.

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Mietelskiej została napisana w języku polskim. Wszystkie rysunki są przejrzyste, czytelne, starannie przygotowane i wzbogacają lekturę pracy. Występują niewielkie błędy edytorskie, które nie przeszkadzają podczas czytania rozprawy.

Wyniki prac badawczych opisanych w rozprawie doktorskiej Pani mgr Moniki Mietelskiej zostały zaprezentowane w trzech artykułach opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Pierwszo-autorska praca Doktorantki zatytułowana „Damage Evaluation in Charged Particle Radiotherapy: Simulation Study Based on Cell Survival Database” opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* jest bardzo obszerna i obejmuje większość wyników opisanych w niniejszej rozprawie. Badania radiobiologiczne w jakich uczestniczyła Autorka rozprawy zostały opublikowane w jeszcze jednej pracy. W mojej opinii jest to adekwatny dorobek naukowy do ubiegania się o tytuł naukowy doktora.

SZCZEGÓŁOWE UWAGI DO ROZPRAWY

Podczas czytania rozprawy nasuwają się pewne bardziej szczegółowe pytania oraz zagadnienia:

- 1) W tej rozprawie wykorzystano jako model biologiczny linię komórkową V 79 mimo, iż jak pisze Autorka, jedną z charakterystycznych cech tej linii jest brak niezmodyfikowanego białka p53 i związany z tym brak uczestniczenia genu MDM2 w naprawie uszkodzeń DNA. Jak zdaniem Autorki zmiana modelu mogłaby wpłynąć na otrzymane wyniki?

Wykorzystanie danych zebranych przez innych badaczy jest bardzo wartościowym podejściem ale niesie ze sobą dość duże ryzyko związane z różnorodnością procedur eksperymentalnych i analitycznych stosowanych w różnych laboratoriach, na co zwraca uwagę Autorka rozprawy. Jestem ciekawa opinii Doktorantki odnośnie zbioru ogólnych wytycznych (poza kryteriami przedstawionymi w pracy dotyczącymi linii V 79) odnośnie statystyki, udostępniania surowych danych, protokołów biologicznych, jakie powinny spełniać

dane radiobiologiczne aby mogły one zostać wykorzystane przez innych badaczy.

- 2) W podsumowaniu, Autorka rozprawy zwraca uwagę na to, iż wielkość R_2 nie uwzględnia, że aby doszło do letalnego przerwania DNA przynajmniej jedno uszkodzenie musi powstać na każdej z nici. Odpowiadające takiej sytuacji pomiary nanodozymetryczne wymagałyby uwzględnienia dwóch sąsiadujących targetów, a taka konfiguracja eksperymentalna jest wysoce skomplikowana co uniemożliwia zastosowanie w środowisku klinicznym. Czy zdaniem Autorki zastosowanie podejścia uwzględniającego konieczność powstania dwóch uszkodzeń w dwóch niciach może znaczący sposób wpłynąć na wyniki?
- 3) Na stronach 32 i 33 przedstawiona jest nanodozymetryczna reprezentacja DNA wykorzystywana w obliczeniach MC. Autorka przedstawia porównanie dwóch modeli o różnej geometrii w pierwszym podejściu DNA nawinięte jest na dyski reprezentujące nukleosomy natomiast uproszczona geometria obejmuje losowo rozmieszczone cylindry reprezentujące objętość około 10 par zasad DNA (średnicy 2,3 nm i wysokości 3,4 nm). Jak przedstawiono w pracy badania dowodzą, iż szczegóły geometryczne wpływają na otrzymane wartości rozkładu rozmiaru klastra jonizacyjnego ICSD w szczególności średniego rozmiaru klastra (M_1) w funkcji liniowego przekazu energii LET dla wysokich wartości LET. Natomiast otrzymano tożsamą zależność pomiędzy M_1 a `skumulowanym prawdopodobieństwem F_k dla obu geometrii. Jestem ciekawa opinii Doktorantki odnośnie potencjalnego uwzględnienia w modelach dynamiki zmian molekularnych w ramach nici DNA tj zmian konformacyjnych czy powstawania wiązań krzyżowych spowodowanych uszkodzeniami. Zmiana konformacji może zmienić przekrój czynny (między innymi z powodu lokalnych zmian gęstości molekularnej) na indukcję uszkodzeń. Czy możliwe jest zaimplementowanie zmian konformacyjnych w symulacjach MC? Jaki wpływ taka modyfikacja miałaby na wyniki?
- 4) Przykłady drobnych błędów edytorskich lub niefortunnnych sformułowań:
 - Strona 31: „... zdefiniowania przez ściankę z Mylaru” powinno być „zdefiniowania przez ściankę z folii Mylar”.
 - Strona 50: „Ogranicza je ściana boczna cylindra zbudowana z folii Mylar o grubości 1 mg/cm²” powinno być „Ogranicza je ściana boczna cylindra zbudowana z folii Mylar o gramaturze 1 mg/cm²”.
 - Strona 97: „Potencjał wielkości nanodozymetrycznych w charakteryzowaniu jakości promieniowania nie ogranicza się dyskutowanej proporcjonalności między R_2 i $\sigma_{5\%}$.” powinno być „Potencjał wielkości nanodozymetrycznych w charakteryzowaniu

jakości promieniowania nie ogranicza się do dyskutowanej proporcjonalności między R_2 i $\sigma_{5\%}$.”

„Odpowiedni pomiar nanodozymetryczny wymagałby zastosowaniu dwóch sąsiadujących targetów...” powinno być „Odpowiedni pomiar nanodozymetryczny wymagałby zastosowania dwóch sąsiadujących targetów...”

Powyższe uwagi/komentarze nie zmieniają mojej wysokiej oceny rozprawy, raczej są sugestią do dyskusji, która może zostać podjęta podczas obrony pracy.

PODSUMOWANIE

Biorąc pod uwagę duże znaczenie podjętej tematyki badawczej, kompleksowe, dogłębne i systematyczne podejście do wykonywanych prac badawczych i analizy danych, Prace doktorską Pani mgr Moniki Mieltskiej oceniam bardzo wysoko. W mojej opinii niniejsza rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Zrealizowane prace eksperymentalne i wykonane obliczenia teoretyczne pozwoliły osiągnąć cele pracy

Podsumowując uważam, że złożona rozprawa doktorska spełnia w pełni wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnioskuje o dopuszczenie Pani mgr. Moniki Mieltskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę duże znaczenie podjętej tematyki badawczej, kompleksowe, dogłębne i systematyczne podejście do analizy wielkości nanodozymetrycznych, wykonanie unikatowych eksperymentów z wykorzystaniem JC, wykorzystanie wielu zestawów danych radiobiologicznych i ich wnikliwą analizę, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej.