

Dr hab. Andrzej Andrejczuk, prof. UwB
Wydział Fizyki
Uniwersytet w Białymstoku

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Reszczyńskiej zatytułowanej „**Modelowanie odpowiedzi komórkowej na małe dawki promieniowania jonizującego**”

Praca doktorska mgr Reszczyńskiej jest obszernym opracowaniem zagadnień dotyczących wpływu małych dawek promieniowania jonizującego na pojedyncze komórki oraz na organizm człowieka. Po krótkim wstępie, w którym przedstawiono cel, motywację i strukturę pracy Autorka ogólnie omawia zagadnienia szacowania ryzyka związanego z działaniem różnych czynników, a w szczególności ryzyka związanego z ekspozycją na małe dawki promieniowania jonizującego (rozdział 2) oraz zagadnienia mechanizmu oddziaływania promieniowania jonizującego na komórki i ich reakcji na wywołane uszkodzenia (rozdział 3). W dalszej części pracy występują trzy główne rozdziały, w których przedstawione są jakby oddzielne zagadnienia: efekt nadwrażliwości na małe dawki promieniowania jonizującego i badania tego zjawiska przeprowadzone przez autorkę na komórkach limfocytów (rozdział 4), meta-analiza danych dotyczących zapadalności na raka płuc w funkcji dawki promieniowania jonizującego pochodzącego od radonu (rozdział 5) i modelowanie biofizyczne transformacji nowotworowej (rozdział 6). Praca zakończona jest podsumowaniem, w którym po omówieniu najważniejszych wniosków Autorka pisze o planach dalszych badań. Praca zawiera bardzo bogaty spis literatury (ponad 360 pozycji) i zawiera szereg uzupełnień, w których umieszczono dodatkowe informacje oraz obszerne tabele z danymi liczbowymi.

Zagadnienie wpływu małych dawek promieniowania jonizującego na organizmy żywe a w szczególności na człowieka wzbudza zainteresowanie od wielu lat i jest przedmiotem coraz większej ilości badań. Prace prowadzone przez mgr Reszczyńską wplatają się w ten nurt i są cennym wysiłkiem podjętym w celu rzetelnego określenia zależności dawka-efekt w obszarze małych dawek jak i zbadania mechanizmów biologicznych prowadzących do obserwowanych relacji. W rozdziale 4 opisane są testowe badania przeprowadzone przez Autorkę dotyczące zjawiska nadwrażliwości na małe dawki promieniowania (ang. Hyper-Radiosensitivity, HRS). Badania te wykonano na komórkach limfocytów pobranych od 6 osób. Preparaty zawierające limfocyty w różnych fazach cyklu komórkowego (G0 i G2) były naświetlane promieniowaniem rentgenowskim w zakresie dawek od 0 do 1.5 Gy. Wielkością mierzoną była koncentracja komórek, w których wykrywano mikrojądra, obiekty które pojawiają się w komórkach w wyniku błędów w podziale materiału genetycznego spowodowane uszkodzeniami nici DNA. Metoda badania występowania mikrojąder jest metodą stosowaną w tzw. dozymetrii biologicznej i jej działanie jest dobrze sprawdzone w obszarze dużych dawek (>0.3 Gy). W tym przypadku starano zastosować tę metodę dla dawek mniejszych. Niestety ilość prób oraz dokładność statystyczna opisanych w rozprawie pomiarów jest niska i według recenzenta nie można stwierdzić czy różnice w przebiegu krzywej dawka-efekt są wynikiem różnic osobniczych (których szukano) czy przypadkową fluktuacją. Analiza danych otrzymanych w szerszym zakresie dawek (do 1.5 Gy) pokazała, że prawdopodobieństwo występowania mikro jąder w komórkach napromienionych w fazie G2 jest generalnie mniejsze niż w komórkach napromienionych w fazie G0 a dodatkowo zmniejsza się dla dużych dawek, co jest sprzeczne z oczekiwaniami. Autorka wyjaśnia, że w eksperymencie wystąpił efekt blokady cyklu komórkowego w przypadku naświetlania komórek w fazie G2 co spowodowało obserwowane rozbieżności. Pomimo to recenzent

uważa za dość ciekawe badanie tego typu efektów, poczynione zaś obserwacje bez wątpienia pomogą w zaplanowaniu kolejnej fazy eksperymentu z większą liczbą uczestników.

Rozdział 5 poświęcony jest zagadnieniom ryzyka zachorowalności na nowotwór płuc związanego z narażeniem na promieniowanie jonizujące pochodzące od radonu występującego w środowisku naturalnym. Po wstępnym przedstawieniu problemu, w pierwszej części rozdziału, Autorka przedstawia meta-analizę wyników 32 badań klinicznych oraz 2 badań epidemiologicznych wyselekcjonowanych z literatury światowej, w których podano wystarczająco dokładne dane dotyczące innych czynników wpływających na prawidłowe ustalenie dawki oraz dotyczyły niskich koncentracji radonu (poniżej 1 kBq/m^3). W meta-analizie użyto metodę najmniejszych kwadratów oraz metodę Bayesa do dopasowania zależności liniowej do zebranych danych. Z tej bardzo starannej analizy danych wynika, że ryzyko raka płuc nie zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia radonu w zakresie do ok. 800 Bq/m^3 . Ta część pracy zawiera materiał opublikowany w pracy Dobrzyński i inni [1] w której mgr Reszczyńska jest trzecim autorem, zatem należy sądzić, że jej wkład w tych badaniach nie był wiodący. W drugiej części rozdziału 5 natomiast rozpatrywany jest problem analizy bardzo obszernych danych epidemiologicznych dotyczących zachorowalności na raka płuc opublikowanych w pracy Simeonova i Himmelsteina [2], z których można było wyekstrahować dane między innymi w funkcji koncentracji radonu. W rozprawie zastosowano bardzo uważną analizę danych. Najpierw wyselekcjonowano podgrupę osób zamieszkujących miejsca w przedziale wysokości ponad poziomem morza (200-275) m w którym koncentracja radonu jest równomiernie reprezentowana w najszerszym zakresie. Do danych dopasowano zależności liniowe oddzielnie dla mężczyzn i kobiet. Dodatkowo ograniczono dane do zbliżonej wartości poziomu promieniowania UVB (945-1245) kJ/m^3 . We wszystkich przypadkach dopasowanie zależności liniowej wskazywało na nieznaczne zmniejszenie się częstości zachorowań na raka płuc w funkcji koncentracji radonu w powietrzu. Jest to kolejny wynik świadczący o braku korelacji zachorowań na raka płuc z narażeniem na niewielkie koncentracje radonu w środowisku. Autorka podkreśla jednak, że dane epidemiologiczne obarczone są dużą niepewnością i wnioski należy wyciągać dopiero po przeprowadzeniu dedykowanych eksperymentów na komórkach i na podstawie przetestowanych modeli biofizycznych rozwoju nowotworów. Ta część pracy jest materiałem publikacji Reszczyńska i inni [3], i wydaje się że rola Autorki jest w tych badaniach znacząca.

Rozdział 6 jest poświęcony matematycznemu modelowaniu transformacji nowotworowej. Na początku tego rozdziału Autorka referuje kilka modeli już istniejących w literaturze, oraz podaje referencje do wielu publikacji, w których analizowano stochastyczną zależność dawka-efekt. Tu warto podkreślić, że najczęściej cytowanym w recenzowanej rozprawie modelem matematycznym opisującym rozwój nowotworu jest model Gompertzowski, a to zapewne dlatego, że jest to jeden z najprostszych modeli, szeroko cytowany w literaturze, który dobrze zgadza się z wynikami doświadczalnymi. W dalszej części tego rozdziału omawiany jest model LTC („Lesion To a Cancer”), którego współautorką jest mgr Reszczyńska i który został zaproponowany w pracy Dobrzyński i inni [4]. Jak twierdzi Autorka model ten został dodatkowo rozszerzony. Model jest wieloetapowy a każdy etap jest modelowany odpowiednimi funkcjami prawdopodobieństwa zależnymi od mocy dawki, dawki zakumulowanej i czasu, oraz od parametrów procesów biologicznych w komórce. W większości prawdopodobieństwa te są opisywane za pomocą formuł zawierających funkcje wykładnicze i wielomiany pierwszego lub drugiego stopnia. Wartości parametrów tych formuł zostały ustalone zgodnie z wiedzą biologiczną i fizyczną. Można podkreślić, że proponowany model LTC zgadza się z krzywą Gompertza w późniejszych fazach rozwoju nowotworu, jednocześnie jest bardziej realistyczny dla krótkich czasów po zainicjowaniu mutacji nowotworowej. Za pomocą modelu LTC obliczono prawdopodobieństwo warunkowe transformacji nowotworowej w ciągu dnia, roku oraz całego życia. Wynik pokazał, że np. prawdopodobieństwo powstania komórki nowotworowej w wyniku

absorpcji dawki 10 mGy jest o rząd wielkości mniejsze niż prawdopodobieństwo podobnego procesu zainicjowanego w wyniku normalnego metabolizmu komórki w ciągu jednego dnia. W ostatniej części rozdziału 6 Autorka dyskutuje mechanizm rozwoju litego guza nowotworowego zapoczątkowanego powstaniem komórki nowotworowej posługując się mechanizmem występującym w przejściach fazowych a konkretnie perkolacji. W zjawiskach tych następuje gwałtowna zmiana w organizacji układu w pobliżu pewnych parametrów krytycznych. Ma to naśladować obserwowane doświadczalnie gwałtowne zwiększenie tempa przyrostu nowotworu w pewnym momencie jego rozwoju. O ile recenzent dobrze zrozumiał jest to dyskusja jak na razie jakościowa, ale planowane jest zaimplementowanie teorii przejść fazowych do modelowania procesu formowania się guza nowotworowego.

W podsumowaniu swojej rozprawy mgr Reszczyńska podkreśla wagę prawidłowego zbadania wpływu małych dawek promieniowania jonizującego na organizm człowieka. Jeżeli dalsze badania jednoznacznie wykażą, że dawki w granicach poniżej 100 mSv nie zwiększają ryzyka kancerogenezy (a może wręcz je obniżają) w stosunku do ryzyka występującego naturalnie, to wiele procedur diagnostyki medycznej będzie mogło być stosowane częściej i z większą dokładnością, co pozwoli na poprawę wykrywalności chorób nowotworowych a później ich leczenia. Ten argument oraz aspekty społeczne (szkodliwa radiofobia) oraz gospodarcze (nieuzasadnione koszty), o których mgr Reszczyńska pisze w publikacji [5], przekonują recenzenta o wartości rozprawy doktorskiej, którą przestawiła.

Rozprawa zawiera spis tabel, spis rysunków, spis literatury oraz 12 rozdziałów uzupełnień. Niestety pod względem edycyjnym rozprawa nie została zbyt starannie przygotowana. Niektóre podrozdziały są zbyt krótkie (2 zdania), jak na przykład na stronie 48. Różne zakresy osi pionowych na Rys. 4.10 i 4.11 utrudniają porównanie danych między sobą. W tym przypadku zakresy danych nie różnią się aż tak mocno żeby nie narysować ich wszystkich w tej samej skali. W kilku innych przypadkach rysunki są tak małe, że opis osi i wartości zmiennych na nich prezentowanych są nieczytelne. Koronnym przykładem są rysunki 5.14 i 5.15. Autorka w pracy używa wielu skrótów, prawidłowo je definiując podczas pierwszego użycia. Nie zdefiniowała jednak prawidłowo skrótu MN we wzorze 4.11, co spowodowało, że recenzent spędził nad nim trochę czasu, zastanawiając się jakim sposobem indeks mitotyczny ma wartość rzędu 20%, podczas gdy z definicji wynikałoby, że wartość ta powinna być bliska 100%. Spis literatury jest mało przejrzysty. Oddzielenie poszczególnych pozycji zostało zrealizowane przez nieznaczne zwiększenie odstępów między akapitami, co według recenzenta jest niewystarczające. Wydaje się, że wysunięcie pierwszych linii o 3-4 litery w lewo byłoby lepsze. Pozycje literaturowe dla tego samego nazwiska pierwszego autora nie są uporządkowane według lat, co dodatkowo utrudnia ich odnajdywanie. Zdarzają się powtórzenia (np. Becker 1995) lub brak pozycji (np. Moglia i in. 2013 i Stehlik i in. 2018 na stronie 142) albo jest konflikt odwołań do publikacji. Na przykład są trzy pozycje literaturowe, które pasują do odwołania Fornalski i in. 2011 oraz dwie pozycje pasujące do odwołania Fornalski i in. 2015. Wymienione niedociągnięcia wynikają prawdopodobnie z pośpiechu w przygotowaniu rozprawy i według recenzenta nie przyćmiewają bogatego materiału naukowego zawartego w pracy.

Na początku analizowania treści rozprawy recenzent dziwił się, jaki związek może mieć nadwrażliwość radiacyjna limfocytów z nowotworami płuc lub z rozwojem nowotworów litych w tkankach. Recenzent uważał, że dane epidemiologiczne są w zasadzie jedynymi danymi, na których jak na razie można polegać, dopóki modele biofizyczne nie osiągną takiego stopnia zaawansowania, że będą w stanie przewidzieć rozwój nowotworu począwszy od pojedynczego uszkodzenia komórki do litego guza w skali dziesiątków lat życia organizmu. Jednak recenzent zmienił zdanie gdy w pracy Marples i inni [6] znalazł hipotezę, że zjawisko nadwrażliwości komórek na promieniowanie jonizujące może być przejawem wypracowanej przez ewolucję sytuacji, w której bardziej korzystna dla organizmu

jest śmierć niewielkiej liczby komórek z niewielką liczbą uszkodzeń niż ryzyko mutacji związane z uruchomieniem mechanizmów naprawczych, które pozostawia komórki przy życiu. To całkiem prawdopodobne wytłumaczenie pokazuje jak wysublimowana może być reakcja pojedynczej komórki. Jest zatem całkowicie uzasadnione prowadzenie badań in vitro oddziaływania niskich dawek na wszystkie rodzaje komórek ludzkiego organizmu, aby dokładniej poznać procesy biochemiczne jakie wtedy zachodzą. Ponieważ takie eksperymenty wykonuje się znacznie łatwiej niż eksperymenty na zwierzętach czy na ludziach będzie można zebrać bogaty materiał doświadczalny. Recenzent ma nadzieję, że numeryczny symulator procesów kancerogenezy, stworzony przez grupę Profesora Ludwika Dobrzyńskiego, będzie rozwijany w taki sposób aby można było za jego pomocą obliczyć prawdopodobieństwa powstania nowotworu nie tylko w normalnej tkance człowieka ale również przewidzieć zachowanie komórek hodowanych w warunkach laboratoryjnych. Zgodne wyniki pomiędzy symulacjami i eksperymentem in vitro będą potwierdzeniem, że części programu działają prawidłowo i że w związku z tym przewidywania w skali całego organizmu są również wiarygodne.

Podsumowując, uważam że dorobek naukowy mgr Reszczyńskiej jest zadowalający i że jej badania są ważnym krokiem w określeniu wpływu małych dawek promieniowania jonizującego na człowieka. Stwierdzam, że przedstawiona praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie magister Joanny Reszczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bibliografia

- [1] Dobrzyński L., Fornalski K. W. and Reszczyńska J., "*Meta-analysis of thirty-two case-control and two ecological radon studies of lung cancer*", Journal of Radiation Research 59 (2018) 149–163
- [2] Simeonov K. P. and Himmelstein D.S., "*Lung cancer incidence decreases with elevation: evidence for oxygen as an inhaled carcinogen*", PeerJ 3:e705; DOI 10.7717/peerj.705
- [3] Reszczyńska J., Pylak M., Fornalski K.W., Mortazavi S. J. and Dobrzyński L., "*Methodological problems in epidemiological data: the case of correlation between Radon level and lung cancer*", submitted to International Journal of Low Radiation (2019)
- [4] Dobrzyński L., Fornalski K. W., Reszczyńska J. and Janiak M. K., "*Modeling cell reactions to ionizing radiation: from a lesion to a cancer*", Dose Response 17 (2019) 1-19
- [5] Reszczyńska J. i Dobrzyński L., „*Problem zasad ochrony radiologicznej w obszarze małych dawek promieniowania*”, Biuletyn Informacyjny Państwowej Agencji Atomistyki-Bezpieczeństwo Jądrowe i Ochrona Radiologiczna 107 (2017) 32-40
- [6] Marples B., Wouters B. G., Collis S. J., Chalmers A. J. and Joiner M. C., "*Low-dose hyper-radiosensitivity: a consequence of ineffective cell cycle arrest of radiation-damaged G₂-phase cells*", Radiation Research 161 (2004) 247–255



Dr hab. Andrzej Andrejczuk, prof. uwB