

Katowice / 3-03-2020

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Michaliny Gramatyki
zatytułowanej

„Ocena wpływu promieniowania jonizującego na metabolizm kardiomiocytów”

Katedra i Zakład
Biofarmacji

Wydział
Farmaceutyczny

z Oddziałem
Medycyny
Laboratoryjnej

41-200, Sosnowiec
ul. Jedności 8
www.sum.edu.pl

Kierownik
Katedry
prof. dr hab. n. farm.

Janusz Kasperczyk
tel.: (+ 48 32) 3641249

SEKRETARIAT

tel.: (+ 48 32) 364 12 67



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Rozprawa doktorska mgr inż. Michaliny Gramatyki pt. **„Ocena wpływu promieniowania jonizującego na metabolizm kardiomiocytów”** została wykonana w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Sokół i dotyczy oceny wpływu niskich dawek promieniowania jonizującego na zmiany w profilu metabolicznym komórek serca. Rozprawa składa się z trzech oryginalnych artykułów opublikowanych w dobrych czasopismach z listy filadelfijskiej w *International Journal Radiation Biology* IF2.266, w *Acta Biochimica Polonica* IF1.239 oraz w *Journal of Radiation Research* IF2.014. We wszystkich w/w publikacjach Pani Michalibna Gramatyka jest pierwszym autorem a w 1 i 3 autorem korespondencyjnym. Wprowadzeniem do lektury w/w publikacji jest dwustronicowe streszczenie rezultatów przeprowadzonych prac badawczych w języku polskim i angielskim, poprzedzone wykazem stosowanych skrótów. Następnie na 12 stronach zwięźle przedstawiono założenia i cel pracy, zastosowane w badaniach materiały i metody oraz uzyskane wyniki badań i wnioski. Każda zamieszczona publikacja poprzedzona jest krótkim 2 stronicowym wprowadzeniem w języku polskim. Taki układ pracy doktorskiej jest przyjazny dla czytelnika, krótko i jasno przedstawione są wszystkie niezbędne informacje aby zrozumieć dlaczego postawiono taką a nie inną hipotezę badawczą i w jaki sposób zaplanowano wszystkie niezbędne badania i analizy do jej weryfikacji.

Na podstawie doniesień literaturowych, w których badano mechanizmy molekularne odpowiedzialne za toksyczność niskich dawek promieniowania jonizującego sformułowano hipotezę, że metabolomika umożliwiająca identyfikację niskocząsteczkowych metabolitów w próbce biologicznej, zarówno w ocenie globalnej w postaci profilowania metabolomicznego jak i w monitorowaniu zmian stężeń wybranych metabolitów w postaci analizy celowanej, może być cennym narzędziem umożliwiającym identyfikację osób o zwiększonym ryzyku kardiotoxyczności po ekspozycji na promieniowanie jonizujące.

Pierwsza publikacja z cyklu prac przewodu doktorskiego pt. *„Radiation Metabolomics in Quest of Cardiotoxicity biomarkers. The review”* jest pracą przeglądową, w której przedstawiono szkodliwe działanie promieniowania jonizującego na komórki i tkanki na poziomie molekularnym z uwypukleniem kardiotoxyczności. Opisano efekty wpływu średnich i niskich dawek promieniowania jonizującego na organizm i próby określenia biomarkerów charakterystycznych przy ekspozycji na promieniowanie. Przedstawiono metabolomikę jako metodę umożliwiającą poznanie mechanizmów rozwoju chorób sercowo naczyniowych po ekspozycji na niskie dawki promieniowania jonizującego. Pokazano dwie najpopularniejsze techniki wykorzystywane w badaniach metabolomicznych: spektrometrię mas i spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego wysokiej rozdzielczości. Szczegółowo również przedstawiono doniesienia literaturowe dotyczące wyników badań metabolomicznych w modelach komórkowych i in-vivo zwierzęcych uzyskanych w celu poznania mechanizmów toksyczności promieniowania jonizującego. Dane literaturowe dowodzą, że zmiany w metabolomie zależą od dawki i typu promieniowania, czasu od ekspozycji na promieniowanie i rodzaju organu na który działało promieniowanie i dotyczą głównie metabolitów związanych z metabolizmem energetycznym, odpowiedzią komórki na stres, integralnością błon komórkowych i procesami zapalnymi. W/w publikacja jest cennym przeglądem najnowszych doniesień naukowych wprowadzająca do dwóch następnych oryginalnych artykułów naukowych.

W 2 publikacji *„Nuclear magnetic resonance spectroscopy reveals metabolic changes in living cardiomyocytes after low doses of ionizing radiation”* przedstawiono rezultaty badania wpływu niskich dawek promieniowania jonizującego na kardiomiocyty w hodowli in vitro. Wpływ promieniowania na profil metaboliczny kardiomiocytów badano przy wykorzystaniu techniki spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego wysokiej rozdzielczości pod kątem magicznym HR MAS, która pozwala prowadzić pomiar na żywych komórkach. Na podkreślenie zasługuje doskonale przygotowany protokół analiz. Komórki napromieniano różnymi dawkami od 1 do 8 Gy i hodowano do 7 dni. Dla każdej próbki wykonano szereg eksperymentów HR-MAS NMR, widma 1D CPMG, 2D J-resolved i 1D Diffusion-edited. Metabolity były identyfikowane na podstawie widm J-resolved i porównywane z przesunięciami

chemicznymi w bazie programu Chemonx NMR. Technika 2D J-resolved okazała się najlepsza do identyfikacji metabolitów ze względu na krótki czas akwizycji w porównaniu z innymi technikami takimi jak COSY TOCSY czy HSQC. Jednowymiarową projekcję widm 2D J-resolved (p-Jres) zastosowano do określenia intensywności sygnałów od metabolitów o niskich masach molowych. Oczywiście wszystkie widma były normalizowane. Część eksperymentalna pracy dotycząca badań żywych kardiomiocytów metodą HR MAS jest przeprowadzona perfekcyjnie z wykorzystaniem nowoczesnych technik NMR, przez co uzyskane wyniki są w pełni wiarygodne. Stwierdzono, że dawka 2Gy promieniowania jonizującego nie ma wpływu zarówno na żywotność kardiomiocytów jak i intensywność apoptozy. Jednakże analiza profilu metabolicznego wykazała zaburzenia w zawartości niektórych metabolitów, zaobserwowano zarówno wzrost jak i spadek stężenia szeregu metabolitów w porównaniu do poziomu prób kontrolnych. Szczegółowa analiza zmian metabolicznych prowadzi do konkluzji, że niskie dawki promieniowania mogą inicjować program śmierci komórek w kardiomiocytach, a procesy wywoływane przez promieniowanie mogą prowadzić do kardiotoxyczności. Ponadto promieniowanie jonizujące indukuje stres oksydacyjny, ma wpływ na szlaki energetyczne i uszkodzenia struktury błon kardiomiocytów co może doprowadzić do śmierci komórek nawet przy niskich dawkach. Identyfikacja zmian metabolicznych wywołana niskimi dawkami promieniowania może umożliwić wczesne wykrycie zmian prowadzących do rozwoju chorób sercowo- naczyniowych.

W 3 publikacji „*Metabolic changes in mice cardiac tissue after low dose irradiation by means of ¹H NMR spectroscopy*” przedstawiono rezultaty badań nad wpływem niskich dawek promieniowania jonizującego na mięsień serca myszy. Badano efekt krótkoterminowy napromieniowania 48 godzin oraz długoterminowy po 20 tygodni. Przeprowadzone badania histopatologiczne wykazały brak wpływu promieniowania na włóknienie tkanki jak i na apoptozę komórek serca. Jednakże analiza metabolomiczna z wykorzystaniem spektroskopii ¹H-1 NMR wykazała wpływ niskich dawek promieniowania na zaburzenia poziomu szeregu metabolitów. Zaobserwowano statystycznie istotne zmiany poziomu metabolitów polarnych w 48 godz. po ekspozycji na promieniowanie w dawce 2 Gy. W przypadku tej dawki zaobserwowano również zaburzenia profilu metabolicznego 20 tygodni po ekspozycji na promieniowanie, obniżone poziomy glutaminy i acetylokarnityny. Poziom stężenia pozostałych metabolitów, u których zaobserwowano zmianę po 48 godzinach, powrócił do wartości obserwowanych u zwierząt kontrolnych. Na podkreślenie również w tej pracy zasługuje doskonały warsztat badawczy zastosowany do wykonania badań i analiz. Przygotowano protokół pomiarów techniką spektroskopii NMR wysokiej rozdzielczości i przeprowadzono pomiary i wykonano widma dwoma technikami NOESY (Nuclear overhauser spectroscopy) i 2D J-resolved. Podobnie jak w pracy dotyczącej analizy kardiomiocytów z

wykorzystaniem HR MAS przesunięcia chemiczne linii rezonansowych pochodzących od poszczególnych metabolitów były identyfikowane przy pomocy programu Chenomx NMR i J-Resolved widma w projekcji jednowymiarowej użyto do ilościowej oceny poszczególnych metabolitów w próbce. Zwierzęta do badań były podzielone na 4 grupy po 5 w każdej grupie. Pierwszą z grup była grupa kontrolna nie naświetlana, druga i trzecia grupa naświetlane dawką 2 Gy do pomiarów po 48 godz. i 20 tygodniach i czwarta grupa naświetlana 0,2 Gy do pomiarów po 20 tygodniach. Ponieważ u tej samej myszy nie możemy obserwować wpływu promieniowania na zmianę poziomu metabolitów w mięśniu sercowym istotny jest dobór grupy zwierząt do badań najlepiej o bardzo zbliżonych metabolomach. Nasuwa się pytanie, czy przed przystąpieniem do eksperymentu wykonano oznaczenia poziomu metabolitów we krwi metodami H-1 NMR myszom przeznaczonym do badań i dokonano selekcji i wybrano tylko te z bardzo zbliżonym poziomem wszystkich metabolitów. Taka selekcja zwiększa prawdopodobieństwo prawidłowej oceny uzyskanych rezultatów zmian poziomu poszczególnych metabolitów, zdając sobie sprawę, że w grupie badanej mamy tylko 5 zwierząt.

Jednakże wyniki tej pracy wyraźnie wskazują na wpływ promieniowania jonizującego o niskich dawkach na poziom szeregu metabolitów w tkance serca myszy. Takie różnice zaobserwowano nie tylko 48 godzin po napromieniowaniu, co odpowiadało bezpośrednim wczesnym efektem promieniowania, ale także 20 tygodni po napromieniowaniu, co odpowiadało klinicznie istotnym późnym skutkom promieniowania. Zmiany poziomu określonych metabolitów były związane z podobnymi procesami metabolicznymi. Ponadto zaburzenia procesów związanych z tymi metabolitami można skorelować z uszkodzeniem i nieprawidłowym działaniem mitochondriów, co jest ogólną cechą napromieniowanych komórek, w tym kardiomiocytów.

Podsumowując, chcę podkreślić, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Michaliny Gramatyki prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny. Stanowi istotny wkład w badaniach nad możliwą kardiotoxycznością promieniowania jonizującego nawet bardzo niskich dawek. Otwiera też pole do badań wpływu promieniowania jonizującego niskich dawek na inne narządy. Pokazuje również możliwości wykorzystania spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego i szeregu technik tej metody do oceny zmian metabolomu zachodzących w tkankach pod wpływem promieniowania jonizującego. Przedstawiony zakres badań i zastosowane metody badawcze doprowadziły do założonego celu. Rozprawa doktorska reprezentuje wysoki poziom z uwagi na rangę rozwiązanego problemu badawczego, jak i zakres przeprowadzonych badań, wyróżnia się oryginalnością zastosowanych metod i narzędzi badawczych i ma walory zarówno poznawcze jak i użytkowe. Możliwość poznania mechanizmów kardiotoxyczności promieniowania i opracowanie

metod monitorowania niekorzystnych zmian w organizmie wywołanych promieniowaniem jonizującym umożliwi przeciwdziałanie rozwojowi schorzeń kardiologicznych.

Podkreślenia wymaga również fakt zdobycia przez doktorantkę finansowania na badania z Narodowego Centrum Nauki i uzyskania grantu w konkursie PRELUDIUM „Zmiany w profilu metabolicznym kardiomiocytów i mięśnia sercowego zachodzące pod wpływem niskich dawek promieniowania jonizującego” 2015/17/N/NZ7/04101.

Rozprawa doktorska spełnia warunki wyróżnienia rozpraw doktorskich obowiązujące w Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej –Curie. Biorąc pod uwagę przedstawioną powyżej ocenę rozprawy składam wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Michaliny Gramatyki pt. **„Ocena wpływu promieniowania jonizującego na metabolizm kardiomiocytów.**

Na zakończenie chciałbym podkreślić, że rozprawa doktorska spełnia warunek rozwiązania oryginalnego problemu naukowego. W rozprawie doktorantka wykazała ogólną wiedzę teoretyczną w danej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Pani mgr Michalina Gramatyka wykazała w rozprawie doktorskiej umiejętność prowadzenia prac badawczych oraz poprawnego i przekonującego przedstawiania uzyskanych przez siebie wyników badań. Rozprawa w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. z 2016 r. poz.882 ze zm. Dz.U. z 2016 r. poz. 1311) i jednoznacznie, z pełnym przekonaniem wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony.

