

Warszawa, 10 marca 2020 r.

Prof. dr hab. Anna Lankoff
Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16
03-195 Warszawa

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr inż. Michaliny Gramatyki

pt.: Ocena wpływu promieniowania jonizującego na metabolizm kardiomiocytów

Recenzja została wykonana w odpowiedzi na pismo Koordynatora ds. przewodów doktorskich Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego, prof. dr hab. n. med. Zbigniewa Noweckiego, z dnia 14 lutego 2020 roku (pismo nr RNK-000/221/20), na mocy której zostałam powołana na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Michaliny Gramatyki.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Michaliny Gramatyki została przygotowana w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowym Instytucie Badawczym, Oddziale w Gliwicach, pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Sokół. Rozprawa została przedstawiona w formie 67-stronicowego dzieła, obejmującego streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy, założenia i cel pracy, materiały i metody, omówienie wyników i wnioski, publikacje prac tworzących rozprawę doktorską oraz podsumowanie i piśmiennictwo. Prace tworzące rozprawę doktorską są spójne tematycznie i zostały opublikowane w latach 2018–2020 w czasopismach naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports/Web of Science [International Journal of Radiation Biology (IF = 2.266), Acta Biochimica Polonica (IF = 1.239), Journal of Radiation Research (IF = 2.014)]. Wszystkie publikacje są publikacjami wieloautorskimi, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Wkład pracy współautorów oraz Doktorantki w powstanie publikacji został udokumentowany w stosownych oświadczeniach, które potwierdzają, że udział Doktorantki polegał na zbieraniu i opracowaniu dostępnych danych naukowych, współudziale w tworzeniu koncepcji badań, wykonywaniu badań eksperymentalnych, analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz współredagowaniu publikacji.

Przedstawiona rozprawa doktorska dotyczy wpływu promieniowania jonizującego na metabolizm komórek serca. Doktorantka postawiła sobie dwa zasadnicze cele: (1) określenie czy promieniowanie jonizujące zmienia żywotność, morfologię oraz profil metaboliczny kardiomiocytów,

(2) określenie czy promieniowanie jonizujące zmienia morfologię oraz profil metaboliczny mięśnia sercowego.

Punktem wyjścia do badań było wzrastające w ostatnich latach zainteresowanie wpływem promieniowania jonizującego na układ sercowo-naczyniowy. Chociaż mechanizmy i efekty kardi toksyczne wysokich dawek promieniowania jonizującego są już bardzo dobrze poznane, wiedza na temat mechanizmów i długofalowych efektów kardi toksycznych niskich i średnich dawek promieniowania jest bardzo ograniczona. Poświęca się im jednak coraz więcej uwagi ze względu na rosnące ryzyko narażenia na takie dawki, głównie ze źródeł medycznych, ale również ze źródeł środowiskowych czy zawodowych. Wyniki badań epidemiologicznych wskazują na zależność między wzrostem częstości występowania niedokrwiennej choroby serca, zawału, miażdżycy i nadciśnienia, a narażeniem całego ciała lub organu na niskie i średnie dawki promieniowania (0.5 - 5 Gy). Nie pokazują natomiast takiej zależności dla dawek poniżej 0.5 Gy. Efekty kardi toksyczne niskich i średnich dawek obserwuje się wiele lat po ekspozycji, jednak pierwsze zmiany, których kumulacja prowadzi do choroby, pojawiają się niemal bezpośrednio po zadziałaniu bodźca. Wyniki badań sugerują, że kardi toksyczność niskich i średnich dawek może mieć związek z uszkodzeniem mitochondriów, które następnie prowadzi do zaburzeń przemian energetycznych w komórkach, jednak dokładny mechanizm tego zjawiska nie jest znany. W związku z powyższym, jak najbardziej zasadne jest podjęcie tematyki badań, zaproponowanej przez Doktorantkę. Zastosowanie metabolomiki jako narzędzia do badań wpływu promieniowania jonizującego na kardiomiocyty jest interesującym i nowatorskim rozwiązaniem, które powinno przyczynić się do poznania molekularnych mechanizmów, leżących u podstaw rozwoju toksyczności niskich dawek promieniowania jonizującego.

Publikacja 1

Gramatyka M., Sokół M. Radiation Metabolomics in the Quest of Cardiotoxicity Biomarkers. The Review. *Int J Radiat Biol.* 2019, doi: 10.1080/09553002.2020.1704299

Zagadnienia dotyczące wykorzystania narzędzi metabolomiki do analizy kardi toksyczności średnich i niskich dawek promieniowania jonizującego zostały przedstawione przez Doktorantkę w przeglądowej Publikacji 1. Praca ta obejmuje zagadnienia mechanizmów oddziaływania niskich i średnich dawek promieniowania jonizującego na komórki i tkanki, ze szczególnym uwzględnieniem indukcji stresu oksydacyjnego oraz uszkodzenia struktury i funkcji mitochondriów. W dalszej części pracy Doktorantka opisała kardi toksyczne efekty promieniowania jonizującego, które prowadzą do rozwoju chorób kardiologicznych. Omówiła również biomarkery molekularne, które mogą być alternatywą dla markerów stosowanych obecnie w diagnostyce chorób serca. Ponadto, Doktorantka opisała metabolomikę jako technikę umożliwiającą poznanie szczegółowych mechanizmów rozwoju chorób sercowo-naczyniowych w efekcie narażenia na niskie i średnie dawki promieniowania jonizującego. Praca uwzględnia również założenia spektroskopii NMR i spektrometrii mas jako najpopularniejszych metod, które znajdują zastosowanie w obszarze badań metabolomicznych. Doktorantka opisała

również wyniki wybranych badań metabolomicznych, prowadzonych w celu poznania mechanizmów toksyczności promieniowania jonizującego, zarówno w modelach komórkowych i zwierzęcych. Jak wynika z szerokiego przeglądu piśmiennictwa, zmiany metaboliczne indukowane przez promieniowanie jonizujące obejmują przede wszystkim związki chemiczne związane z metabolizmem energetycznym, odpowiedzią komórki na stres, procesami zapalnymi, integralnością błon i funkcjonowaniem wybranych białek. Co interesujące, odpowiedź metaboliczna zależy od dawki i typu promieniowania, czasu jaki upłynął od ekspozycji oraz od badanego organu. Ta potencjalna specyficzność metabolomiki stwarza obiecujące perspektywy wyjaśnienia mechanizmów rozwoju chorób serca, indukowanych promieniowaniem jonizującym oraz opracowania biomarkerów ekspozycji na promieniowanie jonizujące. Publikacja ta w zgrabny sposób uzasadnia wybrany przez Doktorantkę przedmiot badań własnych i stanowi bardzo dobre wprowadzenie do prac eksperymentalnych, związanych z analizą wpływu promieniowania jonizującego na metabolizm komórek serca.

Publikacja 2

Gramatyka M., Skorupa A., Sokół M. Nuclear magnetic resonance spectroscopy reveals metabolic changes in living cardiomyocytes after low doses of ionizing radiation. *Acta Biochim Pol.* 2018; 65(2): 309-318.

W dalszej części rozprawy doktorskiej przedstawiono pracę eksperymentalną, poświęconą badaniom nad wpływem promieniowania jonizującego na ludzkie kardiomiocyty w hodowli *in vitro*. Doktorantka przeprowadziła eksperyment wstępny, w którym napromieniła kardiomiocyty 4 dawkami promieniowania jonizującego (1, 2, 4 i 8 Gy), a następnie analizowała przeżywalność komórek i ich zdolności do tworzenia kolonii z wykorzystaniem testu klonogenego. Eksperyment ten miał na celu identyfikację tzw. dawki progowej, czyli najmniejszej dawki, która wywołuje mierzalny efekt w danym teście. Uzyskane wyniki wykazały, że jedynie dawka 8 Gy obniża istotnie przeżywalność komórek i ich zdolność do tworzenia kolonii. Taki wynik jest dosyć zaskakujący i wynika zapewne ze specyfiki zastosowanych komórek. Niestety, nie znalazłam nigdzie informacji na temat wybranej linii komórkowej. Czy jest to linia pierwotna, czy immortalizowana? Jakiego jest tempa podziałów komórkowych? Do dalszych badań została wybrana dawka 2 Gy, jako dawka najbardziej zbliżona do konwencjonalnej dawki frakcyjnej, stosowanej podczas radioterapii. Wybrana dawka została zastosowana do zbadania wpływu promieniowania jonizującego na przebieg cyklu komórkowego. Uzyskane wyniki wykazały klasyczną dla promieniowania jonizującego blokadę komórek w fazie G2/M cyklu komórkowego, co świadczy o uszkodzeniu DNA i aktywacji procesów naprawczych w komórce. Najbardziej istotnym i ciekawym aspektem tej pracy jest, w mojej ocenie, analiza wpływu promieniowania jonizującego na profil metaboliczny kardiomiocytów z użyciem techniki HR-MAS NMR. Uzyskane wyniki wykazały bowiem zaburzenia poziomu niektórych metabolitów: m.in. wzrost zawartości treoniny, glicyny, waliny, izoleucyny, choliny, glicerofosfocholiny, a także spadek

zawartości glutaminianu, zredukowanego glutationu (GSH), tauryny i hipotauryny, w porównaniu z ich poziomem w próbkach kontrolnych. Wykryto również wzrost sygnałów lipidowych ze zwiększeniem stosunku CH₂/CH₃, jak również wzrost proporcji sygnałów związanych z kreatyną oraz związkami cholinowymi: PCr/Cr, Cho/PCh i GPC/PCh. Zaobserwowane zmiany metaboliczne związane są z odpowiedzią komórki na stres oksydacyjny oraz z zaburzeniami ścieżek związanych z metabolizmem energetycznym, membranami i białkami. Reasumując, wyniki tej pracy wskazują na to, że zmiany metabolizmu kardiomiocytów są indukowane przez dawkę, która nie ma istotnego wpływu na obniżenie przeżywalności komórek. Zatem wydaje się, że analiza profilu metabolicznego kardiomiocytów może pozwalać na wczesne wykrycie zmian molekularnych, które mogą prowadzić do rozwoju kardiotoxyczności.

Publikacja 3

Gramatyka M., Boguszewicz Ł., Ciszek M., Gabryś D., Kulik R., Sokół M. Metabolic changes in mice cardiac tissue after low dose irradiation by means of 1H NMR spectroscopy. *J Radiat Res.* 2019 Dec 16. doi: 10.1093/jrr/rrz079

Kolejna praca dotyczy badań nad wpływem promieniowania jonizującego na mięsień sercowy myszy *in vivo*. Jako model badawczy wykorzystano samice myszy szczepu C57Bl/6NCrl, których serca poddano działaniu promieniowania jonizującego *in vivo*. Serca napromieniono dawkami jednorazowymi 0.2 Gy lub 2 Gy i pobrano je do badań po 20 tygodniach od ekspozycji. Dodatkową grupę myszy napromieniono dawką 2 Gy i pobrano próbki 48 godzin po ekspozycji, tak aby porównać efekt krótkoterminowy (48 godzin) i długoterminowy (20 tygodni). Zmiany zachodzące w tkance serca na skutek promieniowania jonizującego oceniano poprzez barwienie Trichrom wg Massona, umożliwiające ocenę liczby włókien kolagenowych, oraz test TUNEL, umożliwiający ocenę częstości komórek apoptotycznych. Wyniki powyższych testów wykazały, że zastosowane dawki promieniowania jonizującego nie miały wpływu na włóknienie tkanki serca oraz na częstość apoptozy. Podobnie jak w przypadku publikacji 2, najbardziej ciekawym aspektem pracy 3 jest, w mojej ocenie, analiza wpływu promieniowania jonizującego na profil metaboliczny w tkance serca z użyciem techniki 1H NMR. Spektroskopowa analiza zmian metabolicznych wykazała, że relatywnie niskie dawki promieniowania jonizującego indukują zmiany profili metabolicznych, co z czasem może prowadzić do zaburzeń pracy całego mięśnia sercowego. Zaobserwowano istotne różnice pomiędzy efektem wczesnym i późnym, analizowanym w mysich sercach 48 godzin i 20 tygodni po napromienieniu. Choć w poszczególnych grupach badawczych profile metaboliczne różniły się, to metabolity, których poziomy uległy zaburzeniu, uczestniczą w podobnych szlakach metabolicznych, związanych z beta oksydacją kwasów tłuszczowych, produkcją ATP, odpowiedzią na stres oksydacyjny i integralnością błon komórkowych. Szlaki te są w dużej mierze związane z funkcjonowaniem mitochondriów, dlatego obserwowane zmiany metaboliczne mogą wskazywać na ich uszkodzenie.

Reasumując, na podstawie wyników opublikowanych przez Doktorantkę w pracy 1, 2 i 3 można stwierdzić, że techniki NMR i profilowanie metaboliczne są efektywnym narzędziem, które pozwala na detekcję zaburzeń metabolicznych w komórkach i tkance serca, będących efektem napromienienia jednorazowymi dawkami promieniowania jonizującego nie przekraczającymi 2 Gy. Doktorantka w podsumowaniu sugeruje, że wczesna identyfikacja zmian poziomu metabolitów indukowanych przez średnie i niskie dawki promieniowania mogłaby hipotetycznie pozwolić na skuteczny monitoring osób potencjalnie narażonych na rozwój chorób układu krążenia. Jest to bardzo interesujące zagadnienie i w związku z tym ciekawa jestem, jak Doktorantka wyobraża sobie zastosowanie uzyskanych wyników w praktyce klinicznej. Doktorantka sugeruje również, że zmiany metaboliczne, indukowane przez promieniowanie w komórkach układu sercowo-naczyniowego mogłyby być w przyszłości biomarkerami kardiotoxyczności promieniowania jonizującego. Jak wiadomo, idealny biomarker powinien wyróżniać się między innymi wysoką specyficznością narządową, niezależną od wpływu czynników trzecich (takich jak przyjmowane leki, sposób odżywiania, stan nawodnienia pacjenta). Czy popromienne zaburzenia metaboliczne w komórkach serca są wystarczająco swoiste ?

Podsumowanie

Podsumowując, w opinii recenzenta cele pracy zostały sprecyzowane jasno i konkretnie. Treść założeń i rozumowań jest jednoznaczna. Metody badań zostały generalnie poprawnie dobrane. Wyniki pracy są spójne i poszerzają w istotny sposób wiedzę na temat wpływu promieniowania jonizującego na metabolizm komórek serca. Dyskusja własnych wyników badań prowadzona jest w sposób dowodzący doskonałej znajomości nie tylko piśmiennictwa, a także wiedzy ogólnej z zakresu pracy i dowodzi odwagi Autora w formułowaniu własnych wniosków, a także zdolności logicznego i syntetycznego myślenia. W opinii recenzenta uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią niezwykle istotny wkład do osiągnięć naukowych w Polsce i na świecie. Tym niemniej, Doktorantka nie ustrzegła się kilku drobnych nieścisłości w tekście. Między innymi, Autorka określa zastosowane w swoich badaniach dawki promieniowania jako dawki niskie. Według UNSCEAR (Komitet Naukowy ONZ ds. Skutków Promieniowania Atomowego), niska dawka promieniowania wynosi 100 mGy lub mniej. W zastosowaniach medycznych pojawia się nieco inne rozumienie poziomu dawek, gdzie dawki 0.2 Gy i 2 Gy klasyfikowane są odpowiednio jako niskie i średnie, jednak badania wykonane przez Doktorantkę były badaniami radiobiologicznymi, a nie klinicznymi. Moją uwagę zwróciła również prezentacja wyników testu klonogenego w publikacji 2. Doktorantka przedstawiła wyniki testu jako „surviving clones”. Ciekawi mnie, jak ten parametr został wyliczony. Opis rysunku wskazuje na to, że jest to liczba przeżywających klonów. Czy jest to parametr wyliczony na podstawie wydajności klonowania ? Test klonogeny jest „złotym standardem” w badaniach radiobiologicznych, który określa zdolność komórek do proliferacji i tworzenia kolonii. Analiza uzyskanych wyników polega na zliczeniu utworzonych kolonii, a następnie na obliczeniu wydajności klonowania PE (ang.

plating efficiency) i przeżywalności określonej parametrem SF (ang. survival fraction). Pewne wątpliwości budzi również ocena częstości apoptozy na podstawie analizy frakcji komórek subG1. Ocena apoptozy wyłącznie na podstawie frakcji komórek subG1 nie jest wystarczająco wiarygodna, ponieważ obserwowany wzrost tej frakcji może być wynikiem uszkodzenia komórek na skutek mechanicznego stresu (zbyt energiczne pipetowanie czy wirowanie). Rozumiem, że ocena częstości apoptozy była jedynie dodatkiem do badań metabolomicznych, jednak w celu uzyskania wiarygodnych wyników, dotyczących indukcji apoptozy, powinno zastosować się co najmniej 2 różne testy, np. test aneksynowy i oznaczanie aktywności kaspaz. Powyższe uwagi nie wpływają na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Michaliny Gramatyki. Oceniając całość recenzowanej rozprawy należy uznać, iż jest ona świadectwem ogromnej pracowitości Doktorantki. Zawartość merytoryczna rozprawy, która została opublikowana w recenzowanych czasopismach, świadczy o jej dojrzałości naukowej, doskonałym warsztacie badawczym i w pełni uzasadnia ubieganie się o stopień doktora. Wnioskuje zatem o dopuszczenie Pani mgr inż. Michaliny Gramatyki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sanna Laukoff