

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Modelowanie odpowiedzi komórek nowotworowych na stres indukowany terapią

wykonanej przez mgr **Jana Poleszczuka**

pod kierunkiem dr hab. Marii Widel i dr hab. Urszuli Forysź.

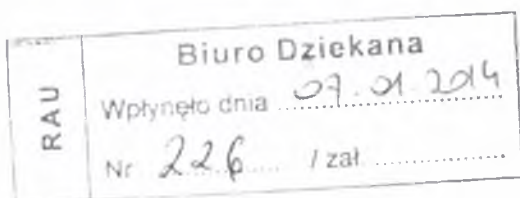
Charakterystyka pracy

Celem pracy doktorskiej jest poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za popromienny efekt sąsiedztwa, czyli efekt polegający na odpowiedzi komórek na uszkodzenie DNA w komórkach znajdujących się w pobliżu. Rozprawa doktorska łączy badania doświadczalne z modelowaniem matematycznym i numerycznym.

-- Badania doświadczalne prowadzone były na liniach komórkowych raka okrężnicy HCT116 z niezmutowanym czynnikiem transkrypcyjnym p53 (HCT116 p53+/+) oraz ze zmodyfikowanym genomem niezawierającym czynnika p53 (HCT116 p53-/-), oraz na linii wyprowadzonej z ludzkich fibroblastów (NHDF). Doświadczenia obejmowały naświetlenie komórek czterema dawkami promieniowania jonizującego (2, 4, 6, i 8Gy) i wyznaczenie frakcji komórek apoptotycznych, komórek w stanie senescencji, oraz frakcji komórek klonogennych (zdolnych do podziału i stworzenia kolonii) dla komórek bezpośrednio naświetlanych i komórek sąsiadujących. Każdy eksperyment był wykonywany w przynajmniej czterech niezależnych powtórzeniach.

-- Modelowanie matematyczne i numeryczne polegało na budowie prostego (atrakcyjnego w swojej prostocie) modelu matematycznego, a następnie rozwinięciu idei do modelu przestrzennego i symulacji dynamiki apoptozy, senescencji i klonogenności komórek za pomocą aparatu komórkowego.

Od strony formalnej praca liczy 109 stron, składa się z 6 rozdziałów, zawierających: (1) wprowadzenie, (2) opis aktualnego stanu wiedzy i postawienie hipotezy badawczej, (3) opis przeprowadzonych badań doświadczalnych, (4) wprowadzenie modelu i porównanie z danymi eksperymentalnymi (5) rozwinięcie idei do modelu przestrzennego i jego analizę w oparciu o symulację aparatu komórkowego oraz (6) podsumowanie. Rozprawę uzupełniają dwa dodatki (A)-- zawierający opis procedur doświadczalnych i numerycznych i (B)-- zawierający opis narzędzi statystycznych. Model zaproponowany w rozdziale 4 jest konfrontowany z eksperymentami przeprowadzonymi przez doktoranta i opisanymi w rozdziale 3. Model przestrzenny (rozdział 5) jest inspirowany eksperymentem E.C. Mackonis i in. 2007 [ref. 67].



Opinia o pracy

Autor stawia następującą **hipotezę badawczą** (w skrócie): efekt popromiennego sąsiedztwa ma źródło we frakcji komórek naświetlonych, które na skutek nienaprawionych uszkodzeń DNA weszły w stan senescencji i charakteryzują się sekrecją pewnych związków (w tym cytokin). Autor postuluje dwa rodzaje oddziaływań: krótkozasięgowe poprzez niestabilne czynniki indukujące uszkodzenia DNA w sąsiednich komórkach (np. tlenek azotu, reaktywne formy tlenu) oraz długozasięgowe poprzez cytokiny stymulujące wzrost.

Hipoteza badawcza jest zatem jasno sformułowana i wydaje się oryginalna. Zgodnie z moją wiedzą nie ma badań dowodzących wpływu komórek senescentnych na frakcje komórek klonogennych w populacji komórek sąsiadujących. Z drugiej strony, ze względu na ogrom czynników potencjalnie odpowiedzialnych za uszkodzenie DNA i liczbę różnych cytokin wydzielanych przez komórki senescentne hipoteza ta jest trudna do wykazania. Autor dobrze dobrał linie komórkowe (HCT116 p53+/+) i (HCT116 p53-/-) charakteryzujące się odpowiednio wysoką (ok 16% dla dawki 8 Gy) i niską (ok 4% dla 8 Gy) frakcją komórek senescentnych. Przeprowadzone badania eksperymentalne pozwoliły na uprawdopodobnienie postawionej hipotezy badawczej i sformułowanie prostego modelu matematycznego, który wykazuje lepszą zgodność z otrzymanymi przez Autora wynikami niż model dotychczasowy (nieuwzględniający efektu sąsiedztwa). Oczywiście, trudno mówić tu o pełnej weryfikacji hipotezy, co wobec ważkości wysuniętej koncepcji i trudności w jej wykazaniu nie jest zarzutem.

Silą przedstawionych modeli matematycznych jest ich wyprowadzenie w oparciu o minimalną liczbę założeń. Doktorant wyraźnie zdaje sobie sprawę, że w przypadku budowy modelu matematycznego liczba założeń i wolnych parametrów musi korespondować z liczbą danych doświadczalnych. Zgodność złożonego modelu matematycznego ze skąpyimi danymi doświadczalnymi nie jest wystarczająca do jego weryfikacji.

Autor w sposób wystarczający przedstawia **dotychczasowy stan badań** i wykazuje się dostateczną wiedzą na temat tej złożonej dziedziny badawczej. Sam fakt podjęcia przez matematyka wyzwania badań doświadczalnych i nauczenia się stosownych metod i podstaw biologicznych zasługuje na uznanie (szczególnie w Polsce!).

Uzyskane wyniki stanowią zachętę do dalszych badań. W szczególności istotne byłoby powtórzenie badań na innych liniach komórkowych oraz podjęcie próby wyznaczenia czynników odpowiedzialnych za uszkodzenie DNA (obniżenie klonogenności) i cytokin odpowiedzialnych za wzrost proliferacji. Wyznaczenie dynamiki wydzielanych czynników i określenie ich wpływu na nienaświetlane komórki mogłoby umożliwić weryfikację hipotezy na poziomie molekularnym. Jest to oczywiście program znacznie wykraczający poza badania możliwe do przeprowadzenia w ramach pracy doktorskiej.

Praca jest wyjątkowo czytelna i napisana starannym językiem. Przeprowadzone doświadczenia są dobrze opisane, a model wprowadzony w sposób zwięzły i klarowny. W oparciu o tekst daje się odtworzyć rozumowanie Autora.

Uwagi. Rozprawę doktorską oceniam wysoko, niemniej mam kilka uwag, które moim zdaniem wymagają przemyślenia przed skierowaniem pracy do publikacji.

1. Efekt popromienny badany jest poprzez porównanie linii p53 (HCT116 p53+/+) charakteryzującej się dużą frakcją senescentnych komórek i p53 (HCT116 p53-/-) o małej frakcji komórek senescentnych. Eksperyment pokazuje większą klonogenność komórek p53-/- pozostających w sąsiedztwie naświetlonych komórek p53-/- niż komórek p53+/+ pozostających w sąsiedztwie naświetlonych komórek p53+/+. Efekt ten tłumaczony jest większą frakcją komórek senescentnych wśród linii p53+/+, może być jednak również wywołany inną wrażliwością komórek p53+/+ i p53-/- na efekt sąsiedztwa (niekoniecznie wywołany czynnikami wydzielanymi przez komórki senescentne). Jeżeli potraktujemy komórki sąsiadujące jako przyrząd pomiarowy – to lepiej byłoby użyć tego samego przyrządu do badania wpływu frakcji senescentnej w linii p53+/+ i p53-/. Innymi słowy, sytuacja, w której komórki sąsiadujące byłyby zawsze z tej samej linii, byłaby chyba metodologicznie bardziej poprawna.
2. Współczynniki dyfuzji [$D = 5 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (podawanie dyfuzji w $\mu\text{m}^2/\text{h}$ jest przejawem nonkonformizmu Autora)] i degradacji [$c = 0.15/\text{s}$] czynnika uszkadzającego komórki (strona 70), oznaczają że efektywny zasięg tego czynnika będzie równy $r = \left(\frac{2D}{c}\right)^{1/2} = 0.2\text{mm}$ (wzór dla dyfuzji w jednym wymiarze, gdyż chodzi o pokonanie drogi między płytką a denkiem insertu), a zatem mniejszy niż odległość denka insertu od płytki hodowlanej równej 0.9mm (strona 20/21). Biorąc pod uwagę, że komórki sąsiadujące były dodatkowo oddzielone porowatą membraną od komórek naświetlonych, tylko niewielka frakcja (<5%) wydzielanego czynnika uszkadzającego mogłaby dotrzeć do komórek sąsiadujących. Submilimetrowy zasięg czynnika uszkadzającego pokazują również przeprowadzone przez Autora symulacje, Rys. 5.11. Spodziewam się, że w rzeczywistości czas życia (przynajmniej niektórych) czynników uszkadzających DNA jest dłuższy niż założone 4s.
3. Brakuje mi porównania modelu opisanego równaniami 4.6 - 4.7 (tj. modelu bez uwzględnienia dodatniego oddziaływania na komórki sąsiadujące) z eksperymentem.

Dodatni (pozytywny) efekt sąsiedztwa opisany jest *de facto* funkcją skokową (Rys. 4.3), ze skokiem w $s=0.044=4.4\%$. Wynik ten jest moim zdaniem prostą konsekwencją faktu, że frakcja senescentna dla linii p53-/- jest maksymalnie równa 3.6% (dla 8Gy), a frakcja senescentna linii p53+/+ jest większa niż 4.4% dla dawki > 2Gy. Wprowadzona modyfikacja modelu zwiększa zatem frakcję komórek klonogennych o ok. 0.01 dla linii p53+/+ dla dawki >2Gy (nie wpływając wcale na profile dla linii p53-/-) i dając pożądaną wypukłość krzywej frakcji komórek klonogennych. Trudno oprzeć się wrażeniu, że dopasowanie długozasięgowego, dodatniego efektu jest silnie zależne od wybranych punktów pomiarowych (dawk promieniowania).

4. Na stronie 71 Autor pokazuje, że czas zbieżności do rozwiązania (stanu) stacjonarnego rozwiązania opisującego rozkład substancji stymulującej jest równy ok. 10min, a substancji uszkadzającej ok. 0.01s. Nie rozumiem tego wyniku. Niezależnie od dyfuzji (degradacja obu czynników nie zależy od położenia), jeśli w pustej przestrzeni (czy skończonej domenie) pojawi się komórka senescentna, to całkowita ilość y substancji wydzielonej (i jeszcze niezdegradowanej) będzie opisana równaniem $dy/dt = s - c y$. Rozwiązanie tego równania dochodzi do stanu stacjonarnego $y=s/c$ w czasie rzędu $1/c$, a zatem ok. 6s dla czynnika uszkadzającego DNA i ok. 50 godzin dla czynnika pro wzrostowego. Prawdopodobnie

ogromna rozbieżność między moim oszacowaniem a wynikiem Autora bierze się z zastosowania normy infimum. Zupełnie nie rozumiem wyboru tej normy, zresztą norma supremum też byłaby nie najlepsza. W każdym razie trudno mówić o dopasowaniu profilu, jeśli całka z rozwiązania (y jest całką po przestrzeni z rozwiązania r -nia 5.7) jest daleka od wartości asymptotycznej.

Reasumując, przybliżenie quasistacjonarności przyjęte w symulacjach numerycznych wydaje mi się wątpliwe.

5. Wydaje mi się, że symulacje modelu przestrzennego należałoby przeprowadzić dla geometrii oddającej doświadczenie E.C. Mackonis i in 2007 [ref. 67], a jeśli symulacja tak dużej płytki jest zbyt kosztowna numerycznie, to z zachowaniem choćby jednego wymiaru (poprzecznego do zasłanianych pasków). Symulacje te warto by przeprowadzić dla bardziej realnych czasów degradacji czynnika uszkadzającego, oraz bez korzystania z wątpliwego przybliżenia quasistacjonarności.

Podsumowując, mimo powyższych uwag **pracę doktorską oceniam wysoko**. Moje uznanie budzi połączenie trudnych eksperymentów biologicznych z modelowaniem matematycznym i numerycznym. Jest ona, w sensie tematyki bądź metod badawczych, kontynuacją dotychczasowych prac doktoranta, które zaowocowały **7 publikacjami z listy Web of Science (32 cytowania, H=4)**. Wszystkie 7 prac zostało opublikowanych w czasopiśmie z $IF > 1.0$.

(Zgodnie z otrzymaną przeze mnie informacją opublikowanie przynajmniej jednego artykułu z $IF > 0.5$ jest warunkiem koniecznym do wyróżnienia pracy zgodnie z wytycznymi Rady Wydziału Automatyki, Elektroniki i Informatyki Politechniki Śląskiej).

W oparciu o treść pracy, sposób jej prezentacji przez Autora na seminarium w IPPT PAN poprzedzającym sporządzenie niniejszej recenzji, oraz dorobek naukowy doktoranta, z pełnym przekonaniem wnoszę o dopuszczenie rozprawy doktorskiej do publicznej obrony, jak i o jej wyróżnienie.

T. Liguziński

