

RAU	Biuro Dziekana	
	Wpłynęło dnia	03.12.2013
	Nr	168 / zał.

Gliwice, 29 listopada 2013

Dr hab. inż. Jarosław Śmieja, prof. nzw. Pol.Śl.  
Instytut Automatyki  
Politechnika Śląska w Gliwicach

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. Jana Poleszczuka pt. *Modelowanie odpowiedzi komórek nowotworowych na stres indukowany terapią*

Promotor: dr hab. n. med. Maria Wideł, Kopromotor: dr hab. Urszula Forys

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy analizy niezwykle istotnych z punktu widzenia medycyny zjawisk zachodzących w populacji komórkowej, poddanej działaniu zewnętrznych czynników indukujących stres komórkowy. Czynniki te są związane ze stosowaną terapią, a w szczególności z radioterapią. Do wspomnianych zjawisk należy m.in. tzw. popromienny efekt sąsiedztwa (*bystander effect*), którego mechanizmy nie zostały dotąd dokładnie poznane, oraz przechodzenie komórek w stan senescencji i związane z tym uwalnianie cząstek sygnalizacyjnych, które mogą mieć ścisły związek z efektem sąsiedztwa. Zrozumienie mechanizmów efektu sąsiedztwa powinno pozwolić na znacznie lepszą ocenę efektywności stosowanych protokołów radioterapii, a w konsekwencji umożliwić optymalizację tych protokołów. W związku z tym należy stwierdzić, że rozpatrywane w pracy problemy są aktualne i dobrze wpisują się w nurt obecnie prowadzonych prac naukowych.

Podstawowym celem postawionym w rozprawie jest weryfikacja oryginalnej, postawionej przez Autora, hipotezy o kluczowej roli programu senescencji komórkowej w powstawaniu popromiennego efektu sąsiedztwa. Dodatkowe cele pośrednie, których realizacja była niezbędna do osiągnięcia celu podstawowego, dotyczyły wykazania zależności pomiędzy liczbą komórek w stanie senescencji a wielkością frakcji przeżywających komórek klonogennych w danej linii komórkowej poddanej napromienianiu i koinkubacji z innymi komórkami, rozszerzenie znanego z literatury radiobiologicznego modelu liniowo-kwadratowego oraz opracowanie oprogramowania służącego do symulacji wzrostu komórek poddanych promieniowaniu w obecności sygnałów wysyłanych przez komórki sąsiednie i analiza otrzymanych wyników symulacji.

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 109 numerowanych stron druku i jest podzielona na sześć numerowanych rozdziałów (w tym Wprowadzenie i Podsumowanie). Spis literatury zawiera 100 trafnie dobranych i właściwie wykorzystanych pozycji. Należy tu podkreślić fakt umieszczenia w bibliografii sześciu artykułów z czasopism naukowych, których współautorem był Doktorant (w tym w czterech przypadkach był pierwszym autorem). Dodatkowo Autor zamieścił w pracy dwa załączniki oraz spisy rysunków i tabel.

Kolejność rozdziałów jest prawidłowa. Zawartość Rozdziału 1 - Wprowadzenia - jest standardowa i obejmuje przedstawienie motywacji podjęcia tematyki, opis celów pracy oraz przewodnik po zawartości kolejnych rozdziałów. Rozdział 2 został poświęcony opisowi tła biologicznego pracy, ze szczególnym uwzględnieniem zjawiska senescencji oraz wyników eksperymentów biologicznych, które stanowiły podstawowy punkt odniesienia dla analizy przedstawionej w pracy. W Rozdziale 3 Autor przedstawił wyniki eksperymentów biologicznych, które zostały przeprowadzone na potrzeby pracy. W Rozdziale 4 została zaproponowana oryginalna modyfikacja radiologicznego modelu liniowo-kwadratowego, opisującego poziom uszkodzeń DNA, wynikających z poddania populacji komórkowej działaniu promieniowania jonizującego. Polega ona na uwzględnieniu uszkodzeń będących wynikiem efektu sąsiedztwa. W Rozdziale 5 Autor przedstawił oryginalny model, oparty na metodzie automatów komórkowych,

opisujący wzrost populacji poddanej działaniu promieniowania jonizującego i uwzględniający różne mechanizmy efektu sąsiedztwa. Pracę kończą właściwie sformułowane wnioski końcowe, zamieszczone w Podsumowaniu. W Dodatkach A i B, zamieszczonych na końcu pracy, Autor zamieścił wzory wykorzystane w obliczeniach oraz kody źródłowe najważniejszych procedur, stanowiących implementację zaproponowanego modelu.

Warto podkreślić, że informacje znane z literatury zamieszczono głównie w podrozdziale 1.1 oraz w Rozdziale 2, które stanowią procentowo bardzo mały fragment pracy. Pozostałe rozdziały prezentują kolejne etapy pracy naukowej Autora. Praca została zredagowana bardzo starannie, zarówno jeśli chodzi o jej strukturę, jak i stronę językową. Można w niej znaleźć jedynie nieliczne błędy literowe czy interpunkcyjne, a całość czyta się z prawdziwą przyjemnością.

Do szczególnie wartościowych, oryginalnych elementów rozprawy, istotnych z naukowego punktu widzenia należy zaliczyć

1. Przedstawienie i analizę serii wyników eksperymentalnych, dotyczących przeżywalności komórek nowotworowych poddanych działaniu promieniowania jonizującego i koinkubowanych z komórkami nienapromienionymi.
2. Zaproponowanie rozszerzenia radiobiologicznego modelu liniowo-kwadratowego i jego weryfikację za pomocą danych eksperymentalnych.
3. Opracowanie modelu wzrostu populacji komórek nowotworowych uwzględniającego uszkodzenia wywołane promieniowaniem jonizującym, przejście komórek w stan senescencji oraz pozytywne i negatywne oddziaływanie cząstek sygnalizacyjnych, uwalnianych przez komórki sąsiednie

Uzyskane wyniki stanowią potwierdzenie osiągnięcia podstawowego celu, jaki Autor postawił we wstępie rozprawy.

Do słabszych stron pracy należą:

1. Niezbyt czytelne sformułowanie udowadnianych w pracy tez. W Podrozdziale 1.2., zatytułowanym Cel i tezy pracy można znaleźć jedynie informację w pierwszym zdaniu "*Podstawą niniejszej pracy jest nowatorska hipoteza o kluczowej roli programu senescencji komórkowej dla występowania popromiennego efektu sąsiedztwa.*" Następnie w ostatnim akapicie Autor pisze, że "*Celem pracy było zweryfikowanie tej hipotezy[...]*". Dalej, w Podrozdziale 2.5. powtórzone zostało zdanie o hipotezie dotyczącej kluczowej roli senescencji, a następnie przedstawiona została nieco inna hipoteza, której sprawdzenie wymagałoby przeprowadzenia eksperymentów na znacznie szerszą skalę (w których, m.in. należałoby w kontrolowany sposób rozmieszczać oddziałujące komórki, by potwierdzić stwierdzenia dotyczące zasięgu oddziaływań). Ponadto, część tej hipotezy nie jest oryginalna, ponieważ różne typy popromiennego efektu sąsiedztwa i ich źródła były już postulowane w literaturze, zresztą jest to wskazane przez Autora w cytowaniach w Rozdziale 2. Natomiast klasyczne sformułowanie trzech tez pracy, które zostały w pełni udowodnione przez Autora, można znaleźć w jego Autoreferacie.
2. Brak zdefiniowania pojęcia "model hybrydowy" - może ono być rozumiane na różne sposoby i stosowanie go w odniesieniu do rozwiązania zaproponowanego w pracy wydaje się nieco wymuszone.
3. W opisie wyników doświadczalnych (Rozdział 3) nie została wyraźnie określona rola Autora w przeprowadzonych eksperymentach - czy aktywnie w nich uczestniczył, czy też zaproponował i przygotował ich plan, czy też jedynie wykorzystał przedstawione wyniki.
4. Sposób, w jaki uwzględniono w proponowanym modelu cykl komórkowy, w tym sposób powiązania ze sobą faz G0 i G1, budzi duże wątpliwości (choć może wynika to z niezbyt precyzyjnego opisu automatu - patrz uwaga 15). Z biologicznego punktu widzenia czym

innym jest wejście w fazę G0, a czym innym zatrzymanie cyklu komórkowego. Prawdopodobnie rozkład czasu przebywania w fazie G0 jest zupełnie inny niż rozkład czasu przebywania w G1, nawet uwzględniając zatrzymanie cyklu w G1. Należałoby również zastanowić się, czy promieniowrażliwość komórek w G0 jest zbliżona do promieniowrażliwości komórek znajdujących się w cyklu komórkowym. Przyjęcie wartości  $\mu = 2.5$  również jest dyskusyjne. W literaturze można znaleźć informację, że faza G1 trwa znacznie dłużej. Trudno zaakceptować także sposób, w jaki w zaproponowanym modelu czynniki wzrostowe prowadzą do szybszego podziału komórki. W przypadku pobudzenia komórki przez te substancje zakłada się, że komórka rozpocznie podział w ciągu pół godziny - co to znaczy rozpocznie podział? Faza S w analizowanych komórkach może trwać 8-10 godzin.

Pozostałe uwagi ogólne i komentarze, jakie nasuwają się podczas uważnej lektury recenzowanej rozprawy doktorskiej dotyczą następujących zagadnień

5. Informacja o rodzajach substancji, związanych z efektem sąsiedztwa, umieszczona w podrozdziale 1.2. powinna być poparta odniesieniem do literatury (które pojawia się dopiero przy dokładniejszym opisie w Rozdziale 2). W przeciwnym wypadku można odnieść wrażenie, że podział substancji ze względu na typ i zakres oddziaływania jest hipotezą Autora.
6. Na str. 17 pojawia się zdanie "*Bez trudu można sobie wyobrazić układ eksperymentalny [...]*" - czy takie eksperymenty są znane z literatury, bądź też jakie mogłyby pojawić się trudności w realizacji takich eksperymentów (ich przeprowadzenie rzeczywiście byłoby wartościowym rozwinięciem tematyki poruszanej w pracy).
7. Jaki rodzaj promieniowania jonizującego został wykorzystany w eksperymentach?
8. Czy na podstawie wyników zaprezentowanych na Rys. 3.5 rzeczywiście można stwierdzić, że wielkość populacji maleje wraz ze wzrostem dawki (duże odchylenia standardowe)? Podobnie rzecz ma się z interpretacją wyników przedstawionych na rys. 3.9 - dla dawek 4 i 6 Gy.
9. Czy rzeczywiście model liniowy jest właściwy dla wyników przedstawionych na rys. 3.14 i 3.15, zwłaszcza w świetle uwag w tekście, dotyczących zakresu stosowalności - może lepiej byłoby zastosować model np. wykładniczy?
10. Wysoce dyskusyjne jest założenie o wspólnej wartości parametrów dla obu linii komórkowych (str. 48), zwłaszcza, że w modelu przedstawionym w dalszej części pracy zakłada się inaczej (patrz str. 65).
11. Dlaczego w zaproponowanym automacie komórkowym sposób uwzględnienia wpływu promieniowania jonizującego został wybrany tak, jak to opisano? Model LQ, którego parametry oszacowano w Rozdziale 4 opisuje liczbę letalnych uszkodzeń DNA (cytowana praca [14])! W modelu opisywanym w pracy letalne uszkodzenia są uwzględnione liniową zależnością, natomiast model LQ służy do zmniejszenia klonogenności komórek.
12. Ekstrapolacja przedstawiona na Rys. 5.7 wydaje się być nadużyciem - raczej nieuzasadnionym z biologicznego punktu widzenia, chyba, że można odwołać się doniesień literaturowych.
13. W jaki sposób zapewnione jest to, że prawdopodobieństwa przejść pomiędzy stanami (w tym te podane na str. 72 i 73) sumują się do 1?

Ponadto nasuwają się następujące uwagi o charakterze dyskusyjnym:

14. Czy bezpośrednio po napromienianiu medium było wymieniane? Jeśli nie, to czy istnieje możliwość, żeby za część obserwowanych efektów odpowiedzialne były cząsteczki będące składnikami medium, zmienione pod wpływem promieniowania?

15. Prezentowane wyniki eksperymentalne dotyczą komórek koinkubowanych. Wydaje się, że aby odpowiedzieć na pytanie, jaki wpływ na przeżywalność frakcji klonogennej ma efekt sąsiedztwa, należałoby je porównać z wynikami uzyskanymi dla napromienionych komórek, które nie były poddane koinkubacji.
16. Zrozumiała jest intencja Autora wprowadzania opisu kolejnych elementów automatu komórkowego w osobnych podrozdziałach, gdyż jest to związane z utrzymaniem ciągłości logicznego rozumowania. Warto byłoby jednak podsumować całość wypunktowaniem stanów automatu i reguł przejść pomiędzy stanami, bądź przedstawieniem rozszerzonego schematu blokowego z Rys. 5.4.
17. Str. 61 - Założenie o jednakowych parametrach komórki macierzystej i potomnej - czy dotyczy to wszystkich parametrów (których w dalszej części pracy pojawia się więcej) - i czy dla wszystkich parametrów takie założenie jest uzasadnione?
18. Dlaczego Autor pisze o odpowiedzi na stres wywołany terapią, a nie na terapię? Co prawda efekty sąsiedztwa mogą rzeczywiście tak być traktowane, to jednak w analizowanych wynikach eksperymentalnych, jak i modelu LQ oraz zaproponowanym automacie komórkowym mamy do czynienia również z bezpośrednim wpływem promieniowania jonizującego, polegającym na letalnym uszkodzeniu komórek.
19. Czy najszersza możliwa definicja efektu sąsiedztwa, przedstawiona na str. 10, rzeczywiście jest najszersza? Czy oddziaływanie w drugą stronę (tzn. komórek nienapromienionych na napromienione) zalicza się do innego typu oddziaływań?
20. Sposób wyznaczania frakcji klonogennych komórek przeżywających został zaczerpnięty z cytowanej literatury. Jakie jest jednak zdanie Autora na temat tej nazwy? Zwykle pojęcie frakcja oznacza zmienną z przedziału  $[0,1]$ , podczas gdy podany sposób wyliczania dopuszcza wartości większe od 1. Ponadto, przy takim sposobie obliczania, nawet przy braku jakichkolwiek dodatkowych mechanizmów (np. związanych z efektem sąsiedztwa), można uzyskać wzrost frakcji klonogennych komórek przeżywających w populacji poddanej naświetlaniu w stosunku do populacji niepoddanej naświetlaniu (np., jeśli dla 100 nienapromienionych komórek zostanie zliczonych 10 kolonii, to  $PE=0.1$ ; natomiast po zastosowaniu leczenia zginie 90% komórek, a z pozostałych utworzy się 5 kolonii, to pomimo efektywnego zmniejszenia populacji  $SF=0.5$ ).
21. Wartość  $\Delta\mu$ , podana na str. 73 wydaje się bardzo mała w odniesieniu do  $\mu$ . Jakie to ma konsekwencje, i czy taki wybór wartości parametru jest uzasadniony?
22. O ile można zauważyć wyraźną korelację pomiędzy senescencją a frakcją przeżywających komórek klonogennych, nie musi to oznaczać zależności przyczynowo-skutkowej. Co prawda przeprowadzone w rozprawie rozumowanie jest poprawne, ale nie może jednak stanowić ostatecznego potwierdzenia tezy o ścisłym związku przyczynowo - skutkowym. Powstaje więc pytanie, czy na obecnym etapie rozwoju technik eksperymentalnych możliwe byłoby zaplanowanie eksperymentu bądź serii eksperymentów, które jednoznacznie potwierdziłyby taką tezę.

Inne uwagi szczegółowe:

23. W strukturze pracy nie powinny się pojawiać pojedyncze, wyodrębnione części (np. 3.3.1 przy braku 3.3.2, czy 4.1.1. przy braku 4.1.2)
24. Na str. 1 powinno znaleźć się odwołanie do oryginalnej pracy Ważewskiej-Czyżewskiej i Lasoty, a nie do [96], która jest pracą przeglądową.
25. Str. 2 - zamiast "stres, jakim jest immunoterapia" powinno być "stres wywołany immunoterapią"
26. Str. 3 - "[...] główną tarczą podatną na uszkodzenia jest DNA" - tarcza to coś, co z założenia chroni...

27. Str. 7 - to nie zjawisko sąsiedztwa zachwiało podstawami radiobiologii, ale jego odkrycie
28. Str. 8 - Błędne sformułowanie "spowolnienie cyklu podziału komórkowego" - podział komórkowy jest procesem, a nie cyklem; ponadto powinno się raczej mówić o zatrzymaniu cyklu komórkowego, a nie jego spowolnieniu
29. Str. 8 - sformułowanie dotyczące zasadniczej roli białka p53 jest błędem i prawdopodobnie wynika ze zbytniego uproszczenia
30. Str. 13 - jak należy rozumieć sformułowanie "należy z optymalizować" (czy można z optymalizować nienależy? Podobnie zresztą razi ostatnie zdanie w Podsumowaniu - "bardziej optymalne protokoły terapii")
31. Str. 64 - tabela 5.1 - dla jakiej dawki promieniowania zostały wyznaczone wartości PE?
32. Dodatek A - str. 94 - sformułowanie "liczba posianych leczonych komórek" jest wysoce nietrafne - tych komórek nie leczymy, tylko chcemy w wyniku leczenia je zabić

Liczba powyższych uwag może wydawać się duża. Jest to jednak związane z oryginalnością recenzowanej pracy a także z jej dużym zakresem. Każda z części pracy (rozszerzony model LQ bądź proponowany model wzrostu populacji nowotworowej) mogłaby stanowić rdzeń osobnej rozprawy doktorskiej. Uważam, że postawiony przez Autora cel został osiągnięty. Praca jest dowodem na to, że Autor posiada bardzo dobre rozeznanie w literaturze dotyczącej wybranego obszaru badań, swobodnie posługuje się zróżnicowanymi metodami badawczymi (eksperyment, metody analityczne, analiza numeryczna), potrafi prawidłowo i czytelnie przedstawić uzyskane wyniki, odnosząc je jednocześnie do światowej literatury. Na szczególną uwagę i pochwałę zasługuje umiejętność poruszania się zarówno w dziedzinie biologii, jak i matematyki.

Reasumując stwierdzam, że mgr Jan Poleszczuk wykazał się wiedzą i umiejętnościami wymaganymi do uzyskania stopnia doktora nauk technicznych w dyscyplinie Biocybernetyka i Inżynieria biomedyczna. Przedstawiona praca doktorska spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim przez odnośne przepisy. Wnoszę o dopuszczenie mgra Jana Poleszczuka do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Jednocześnie, uwzględniając oryginalność zaproponowanych rozwiązań, wartość przeprowadzonych badań i otrzymanych wyników, jak i bardzo dobry dorobek naukowy mgra Jana Poleszczuka (autorstwo m.in. 8 publikacji w czasopismach z ImpactFactor>1) wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

