

Dr hab. n. med. Dorota Słonina, prof. NIO  
Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów  
Narodowy Instytut Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie  
PIB, Oddział w Gliwicach  
[dorota.slonina@io.gliwice.pl](mailto:dorota.slonina@io.gliwice.pl)

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Justyny Miki**

**pt. „Effects of low dose radiation exposure and aging on T cell receptor beta chain (TCR $\beta$ ) repertoire in human and mice”**

1. Wartość naukowa rozprawy - trafność podjętej tematyki badawczej i jej oryginalność

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy aktualnego i ważnego tematu jakim jest, ogólnie mówiąc, mechanizm działania układu immunologicznego, a w szczególności limfocytów T i ich receptorów (TCR) odpowiedzialnych za rozpoznawanie obcych antygenów. Jedną z ról receptorów limfocytów T jest rozpoznawanie antygenów prezentowanych na komórkach nowotworowych i w konsekwencji eliminacja zmienionych komórek. Niestety, komórki nowotworowe potrafią uciec spod nadzoru immunologicznego blokując punkty kontrolne układu odpornościowego na limfocytach T (receptor CTLA-4, PD1 i jego ligand PD-L1) i hamując tym samym przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną. W ostatnich latach zastosowanie inhibitorów punktów kontrolnych układu odpornościowego stało się jedną ze strategii walki z nowotworami. Niestety, immunoterapia u wielu chorych na nowotwory jest nieskuteczna i do tego obarczona poważnymi efektami ubocznymi. Próby identyfikacji czynników predykcyjnych (biomarkerów), na podstawie których można by przewidzieć odpowiedź immunologiczną pacjenta jak na razie nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Warto wspomnieć, że jedną z form immunoterapii jest terapia CAR-T, w której wykorzystuje się własne limfocyty T pacjenta, zmodyfikowane genetycznie i wzbogacone o chimerowy receptor rozpoznający antygeny nowotworowe. Również w przypadku tej terapii przyczyny niepowodzeń nie są poznane. Dlatego też poszukiwanie nowych czynników, które mogą mieć wpływ na funkcjonowanie ludzkiego układu immunologicznego jest pożądanym

przedmiotem badań. Obecnie w badaniach klinicznych testowane są różne strategie mające na celu pokonanie oporności nowotworów na immunoterapię. Jedną z nich jest łączenie immunoterapii z radioterapią niskimi (gdzie mowa o radioterapii) dawkami promieniowania od 0,5 do 2 Gy, które jak wykazano mają zdolność reprogramowania środowiska nowotworu między innymi poprzez zwiększenie nacieku komórek dendrytycznych i limfocytów T CD4 i CD8. Poznanie mechanizmu działania tej terapii wymaga jednak dalszych badań.

Doktorantka w swojej pracy postanowiła skupić się na biologii procesu rekombinacji V(D)J (w wyniku którego powstają geny kodujące receptory limfocytów T) i różnorodności receptorów limfocytów T w zależności od płci, wieku, ekspozycji na niskie dawki promieniowania jonizującego i charakterystyki sekwencji TCR. Do badań Doktorantka wykorzystowała dane dla ludzi zdrowych i myszy oraz dane osób z Kohorty Life Span Study, czyli ofiar ataków jądrowych na Hiroszimę i Nagasaki. Wszystkie dane pochodziły z otwartych baz danych i zostały uzyskane metodami wysokoprzepustowego sekwencjonowania (w tym sekwencjonowania nanoporowego, czyli długich odczytów sekwencyjnych). Celem pracy było dostarczenie schematu analizy do badania różnorodności receptorów limfocytów T w oparciu o dane z sekwencjonowania i cytometrii przepływowej. Do analizy tak dużej ilości danych niezbędne jest zastosowanie specjalnych metod obliczeniowych, programów i algorytmów. Zatem zaproponowany temat badań dobrze wpisuje się w aktualne kierunki badań bioinformatycznych. Analiza różnorodności TCR u indywidualnych osób może w przyszłości wspomóc nie tylko walkę z nowotworami, ale także z chorobami autoimmunologicznymi czy starzeniem się.

## 2. Wartość merytoryczna rozprawy

Praca składa się z 10 rozdziałów. Rozdział 1 to krótki wstęp, w którym Doktorantka uzasadniła cel badań oraz precyzyjnie sformułowała hipotezy badawcze, a także krótko przedstawiła zawartość poszczególnych rozdziałów pracy. W rozdziale 2 Doktorantka umiejętnie wprowadziła czytelnika w tematykę badawczą. Omówiła funkcję układu odpornościowego skupiając się na mechanizmach odporności nabytej i roli limfocytów T i B. Następnie przedstawiła przebieg, dojrzewanie i podział limfocytów T oraz szczegółowo opisała budowę molekularną receptora limfocyta T oraz proces rekombinacji V(D)J. Omówienie tych zagadnień zostało poparte pięknymi kolorowymi rycinami. Ta część pracy napisana jest bardzo jasno i czyta się ją bardzo dobrze.

W rozdziale 3, który jest dalszą częścią wprowadzenia do tematyki rozprawy Doktorantka dokonała przeglądu metod (ich wad i zalet) stosowanych do oceny zmienności repertuaru receptorów limfocytów T oraz metod statystycznych do oszacowania różnorodności TCR. Scharakteryzowała także bazy danych (uzyskanych metodami wysokoprzepustowego sekwencjonowania i cytometrii przepływowej) wykorzystane do badań. Kolejne rozdziały od 4 do 8 omawiają poszczególne tematy badawcze i w obrębie każdego z nich znajdują się podrozdziały wstęp, materiał i metody, wyniki, wnioski i dyskusja. Wyniki przedstawione w rozdziałach 4, 5 i 8 zostały już opublikowane, a te w rozdziałach 6 i 7 są w trakcie publikacji. Należy podkreślić, że metodyka badań, w tym zaawansowane metody obliczeniowe i narzędzia statystyczne do analizy danych zostały opisane dokładnie i zrozumiale. Wszystkie wyniki (a uzyskano ich bardzo dużo) przedstawiono w sposób jasny i logiczny oraz udokumentowano starannie przygotowanymi kolorowymi wykresami i tabelami. Uzupełniające wyniki zawarto w rozdziale 10. Jestem pod wrażeniem ogromu pracy i obliczeń, które wykonała Doktorantka.

Spośród wszystkich uzyskanych przez Doktorantkę wyników mnie jako radiobiologa zatrudnionego w Narodowym Instytucie Onkologii najbardziej zainteresowały te dotyczące wpływu promieniowania jonizującego na różnorodność receptorów limfocytów T uzyskane z badań na myszach oraz od osób z Kohorty Life Span Study. Autorka wykazała, że niska dawka promieniowania 0,1 Gy przyspieszała starzenie się układu immunologicznego zdrowych myszy. Natomiast wyższa dawka 1 Gy spowalniała lub nawet odwracała ten proces. Interesująca byłaby analiza danych pochodzących od myszy z nowotworami, które napromieniono powyższymi dawkami. Ciekawa jest także analiza różnorodności genów V w limfocytach naiwnych i limfocytach pamięci pozyskanych od żyjących ofiar ataków jądrowych na Hiroszimę i Nagasaki, którą Doktorantka przeprowadziła w celu oceny wpływu promieniowania na populację obwodowych limfocytów T w zależności od dawki, wieku w momencie wybuchu i czasu jaki upłynął od tego zdarzenia. W jej wyniku wykazano, że różnorodność genów V w limfocytach wzrastała istotnie wraz z czasem. Z pewnością takie informacje zasilą bazę danych kohorty LSS, która jest głównym źródłem informacji dotyczącej częstości występowania nowotworów popromiennych.

W dyskusji Doktorantka wykazała się dojrzałością, konsekwentnie omówiła uzyskane wyniki i skonfrontowała je z raportami innych autorów. Szkoda, że wnioski z przeprowadzonych badań nie zostały wypunktowane. Zamiast tego w rozdziale 9 przyjęły formę 6-stronicowego

podsumowania. Omówione wnioski odpowiadają jednak na założenia i cele pracy oraz ukazują uzyskane wyniki, które są oryginalnym osiągnięciem badawczym Doktorantki.

### 3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska, napisana w języku angielskim, ma formę monografii liczącej 163 strony i zawiera wszystkie wymagane elementy typowe dla oryginalnych prac badawczych. Szata graficzna jest bardzo atrakcyjna. Praca zawiera 40 rycin i 30 tabel. Uwagę zwraca strona edytorska. Praca została przygotowana niezwykle starannie, przejrzysto i poprawnie stylistycznie. Piśmiennictwo obejmuje 192 pozycje, w większości opublikowane w latach 2010 - 2020, stanowiące przegląd aktualnej światowej literatury dotyczącej omawianej tematyki. Nie mam zastrzeżeń do strony formalnej pracy.

### 4. Uwagi

Jako recenzent nie mam uwag merytorycznych. Wyniki badań będących tematem rozprawy doktorskiej zostały już w większości opublikowane w recenzowanych czasopismach.

Chciałabym jedynie zwrócić uwagę na fakt, że praca doktorska została wydrukowana jednostronnie. Nie jest to zgodne z zasadami zrównoważonego rozwoju, którymi powinniśmy się kierować.

### 5. Ocena końcowa

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani Justyny Miki stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, a jej zawartość merytoryczna i niezwykle staranny sposób przedstawienia wyników świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki. Rozprawa spełnia warunki stawiane pracom na stopień doktora określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Inżynieria Biomedyczna Politechniki Śląskiej o dopuszczenie mgr inż. Justyny Miki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie Inżynieria Biomedyczna.