

Autoreferat

Struktura toru cząstki oraz jej wpływ na uszkodzenie
i naprawę DNA w komórkach ludzkich poddanych
działaniu promieniowania jonizującego

Beata Brzozowska
Wydział Fizyki
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, styczeń 2023

Spis treści

1	Imię i nazwisko	3
2	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	3
3	Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych	3
4	Osiągnięcie naukowe	3
4.1	Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4.2	Spis prac stanowiących podstawę procedury habilitacyjnej	3
4.3	Omówienie osiągnięcia naukowego	6
4.3.1	Wprowadzenie	6
4.3.2	Faza fizyczna oddziaływania promieniowania jonizującego	8
4.3.3	Wpływ fazy chemicznej na uszkodzenia radiacyjne	11
4.3.4	Biologiczne konsekwencje działania promieniowania jonizującego	11
4.3.5	Podsumowanie	15
5	Aktywność naukowa	18
5.1	Fizyka Medyczna na Wydziale Fizyki UW	18
5.2	Uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem o różnych LET	19
5.3	Egzosomy i ich rola w radioterapii	20
5.4	Zastosowanie druku 3D w radioterapii pacjentek z nowotworem piersi	20
6	Osiągnięcia dydaktyczne, organizacyjne oraz popularyzujące naukę	20
6.1	Osiągnięcia dydaktyczne	20
6.1.1	Opieka nad studentami	20
6.1.2	Organizacja nowych zajęć	21
6.1.3	Wyróżnienia i nagrody za działalność dydaktyczną	21
6.1.4	Zajęcia prowadzone dla studentów zagranicznych	21
6.2	Osiągnięcia organizacyjne	21
6.2.1	Laboratorium radiobiologiczne na Wydziale Fizyki UW	21
6.2.2	Innowacyjność	22
6.2.3	Współpraca krajowa i zagraniczna	22
6.3	Działalność popularyzatorska	23

1 Imię i nazwisko

Beata Brzozowska

2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Tytuł magistra, rozprawa: *Produkcja hadronów w obszarze ograniczonej fragmentacji*, Zakład Cząstek i Oddziaływań Fundamentalnych, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski, 2005

Stopień doktora, rozprawa: *Scaled momentum spectra in deep inelastic scattering at HERA*, Zakład Cząstek i Oddziaływań Fundamentalnych, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski, 2010

3 Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych

Zatrudnienie: adiunkt w Zakładzie Fizyki Biomedycznej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego (01.09.2011-obecnie)

Staż podoktorski: Department of Molecular Biosciences, The Wenner-Gren Institute, Stockholm University (01.04.2015–31.08.2016)

4 Osiągnięcie naukowe

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Tytuł osiągnięcia naukowego, stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego, brzmi *Struktura toru cząstki oraz jej wpływ na uszkodzenie i naprawę DNA w komórkach ludzkich poddanych działaniu promieniowania jonizującego*. Osiągnięcie dotyczy badania mechanizmu uszkodzeń i naprawy DNA w komórkach poddanych działaniu promieniowania jonizującego. Efekt działania promieniowania jonizującego na materiał komórkowy został zmierzony w doświadczeniach *in vitro* z wykorzystaniem testów radiobiologicznych oraz zbadany w eksperymentach *in silico* za pomocą metod Monte Carlo (MC).

4.2 Spis prac stanowiących podstawę procedury habilitacyjnej

Spis publikacji, stanowiących spójny cykl, będący podstawą postępowania habilitacyjnego, zawarty jest w tabeli poniżej. Mój indywidualny wkład jest wymieniony w poniższym spisie publikacji oraz w Załączniku nr 3 (Wykaz osiągnięć).

Autorzy (rok)	Tytuł	Czasopismo
(BB1) M. Eriksson, P. Hååg, B. Brzozowska, M. Lipka, H. Lisowska, R. Lewensohn, A. Wojcik, K. Viktorsson, L. Lundholm (2017)	Analysis of chromatin opening in heterochromatic non-small cell lung cancer tumour initiating cells in relation to DNA damaging anti-tumour treatment	International Journal of Radiation Oncology * Biology * Physics 100(1):174-187 (IF=8.013) MNiSW 140 liczba cytowań: 5

<p>Indywidualny wkład:</p> <ul style="list-style-type: none"> — koncepcja i wykonanie analizy danych otrzymanych z wykorzystaniem testu klonogenego; — zaproponowanie nowatorskiej metody badania wielkości kolonii jako miary wielkości uszkodzeń DNA oraz ich kompleksowości w badaniach porównawczych działania promieniowania o różnej gęstości jonizacji; — udział w dyskusji wyników i edycji ostatecznej wersji manuskryptu. 		
<p>(BB2) A. Sollazzo, B. Brzozowska, L. Cheng, L. Lundholm, S. Haghdoost, H. Scherthan, A. Wojcik (2017)</p>	<p>Alpha Particles and X Rays Interact in Inducing DNA Damage in U2OS Cells</p>	<p>Radiation Research 188(4): 400-411 (IF=3.372) MNiSW 70 liczba cytowań: 10</p>
<p>Indywidualny wkład:</p> <ul style="list-style-type: none"> — opracowanie cyfrowych narzędzi analizy wielkości ognisk naprawczych; — przygotowanie narzędzi do automatycznego liczenia ognisk na podstawie zrobionych zdjęć mikroskopowych; — opracowanie i zastosowanie metody kopert addytywności do badania interakcji dwóch rodzajów promieniowania z wykorzystaniem ognisk naprawczych DNA, co było istotnym elementem badań; — udział w dyskusji wyników i edycji ostatecznej wersji manuskryptu. 		
<p>(BB3) A. Sollazzo, B. Brzozowska, L. Cheng, L. Lundholm, H. Scherthan, A. Wojcik (2018)</p>	<p>Live Dynamics of 53BP1 Foci Following Simultaneous Induction of Clustered and Dispersed DNA Damage in U2OS Cells</p>	<p>International Journal of Molecular Sciences 19(2): 519 (IF=6.208) MNiSW 100 liczba cytowań: 24</p>
<p>Indywidualny wkład:</p> <ul style="list-style-type: none"> — koncepcja i wykonanie analizy mobilności ognisk naprawczych, która stanowi znaczną część przedstawionych w pracy wyników ilościowych; — udział w dyskusji wyników i edycji ostatecznej wersji manuskryptu. 		
<p>(BB4) L. Cheng, B. Brzozowska, A. Sollazzo, L. Lundholm, H. Lisowska, S. Haghdoost, A. Wojcik (2018)</p>	<p>Simultaneous induction of dispersed and clustered DNA lesions compromises DNA damage response in human peripheral blood lymphocytes</p>	<p>PLOS ONE 13(10):e0204068 (IF=3.752) MNiSW 100 liczba cytowań: 13</p>
<p>Indywidualny wkład:</p> <ul style="list-style-type: none"> — opracowanie metody badania synergii działania promieniowania jonizującego przy użyciu testu kometowego (koperty addytywności); — zaproponowanie nowej metody porównywania danych radiobiologicznych z wykorzystaniem rozkładów Weibulla; — udział w dyskusji wyników i przy pisaniu manuskryptu. 		
<p>(BB5) B. Brzozowska, M. Gałeczki, A. Tartas, J. Ginter, U. Kaźmierczak, L. Lundholm (2019)</p>	<p>Freeware tool for analysing numbers of cell colonies</p>	<p>Radiation and Environmental Biophysics 58(1): 109-117 (IF=2.017) MNiSW 70 liczba cytowań: 16</p>
<p>Indywidualny wkład:</p> <ul style="list-style-type: none"> — projekt i implementacja oprogramowania do analizy kolonii komórkowych (analiza obrazu, optymalizacja parametrów, stworzenie aplikacji); — zaimplementowanie algorytmu pomiaru dodatkowej cechy danych — wielkości kolonii, która może być wykorzystana do badania skuteczności biologicznej promieniowania jonizującego; — analiza danych otrzymanych w wyniku zastosowania klonogenego testu przeżywalności z wykorzystaniem liczby i wielkości powstałych kolonii; — dyskusja wyników i pisanie manuskryptu. 		

(BB6) M. Gałeczki, A. Tartas, A. Szymanek, E. Sims, L. Lundholm, A. Sollazzo, L. Cheng, Y. Fujishima, M. Yoshida, J. Żygierewicz, A. Wojcik, B. Brzozowska ¹ (2019)	Precision of scoring radiation-induced chromosomal aberrations and micronuclei by unexperienced scorers	International Journal of Radiation Biology 95(9): 1251-1258 (IF=3.352) MNiSW 70
Indywidualny wkład: — pomysłodawczyni projektu; — liczenie abberacji chromosomowych i mikrojąder; — koncepcja i wykonanie analizy statystycznej; — dyskusja wyników i pisanie manuskryptu.		
(BB7) L. Cheng, B. Brzozowska ² , H. Lisowska, A. Wojcik, L. Lundholm (2019)	Impact of ATM and DNA-PK Inhibition on Gene Expression of and Individual Response Human Lymphocytes to Mixed Beams of Alpha Particles and X-Rays	Cancers 11(12): 2013 (IF=6.575) MNiSW 140
Indywidualny wkład: — opracowanie metody badania synergii dla danych genowych (koperty addytywności); — wykonanie analizy kopert addytywności dla wybranych efektów biologicznych; — udział w dyskusji i edycji ostatecznej wersji manuskryptu.		
(BB8) B. Brzozowska , A. Tartas, A. Wojcik (2020)	Monte Carlo modeling of DNA lesions and chromosomal aberrations induced by mixed beams of alpha particles and X-rays	Frontiers in Physics, Medical Physics and Imaging (IF=3.718) MNiSW 20
Indywidualny wkład: — opracowanie metody badania synergii dla danych genowych (koperty addytywności); — wykonanie analizy kopert addytywności dla wybranych efektów biologicznych; — udział w dyskusji i edycji ostatecznej wersji manuskryptu.		
(BB9) M. Pietrzak, M. Mieltska, A. Banczer, A. Ruciński, B. Brzozowska (2021)	Geant4-DNA modeling of nanodosimetric quantities in the Jet Counter for alpha particles	Physics in Medicine and Biology 66(22): 2021 (IF=4.174) MNiSW 100
Indywidualny wkład: — postawienie hipotezy badawczej i określenie zadań; — określenie parametrów symulacji, wybór wielkości uwzględnionych w analizie (opcje fizyki, wydajność nanodozymetru, rozmiar objętości czynnej, procedura skalowania); — opieka nad realizacją projektu; — dyskusja wyników i pisanie manuskryptu.		
(BB10) A. Tartas, M. Filippek, M. Pietrzak, A. Wojcik, B. Brzozowska (2023)	Modeling of dose and linear energy transfer homogeneity in cell nuclei exposed to alpha particles under various setup conditions	International Journal of Radiation Biology doi: 10.1080/09553002.2023.2161659 (IF=3.352) MNiSW 70

¹W tej publikacji pojawia się nazwisko dwuczłonowe: Brzozowska-Wardecka

²W tej publikacji pojawia się nazwisko dwuczłonowe: Brzozowska-Wardecka

Indywidualny wkład:

- pomysłodawczyni tematu badań, określonego na podstawie doświadczenia zdobytego w eksperymentach radiobiologicznych, w szczególności dot. charakterystyki źródeł promieniowania;
- metodologia symulacji komputerowych oraz określenie zadań;
- opieka nad realizacją projektu;
- dyskusja wyników i pisanie manuskryptu.

Treści publikacji znajdują się w Załączniku nr 5, a oświadczenia autorów wspólnych publikacji (oprócz **(BB3)**, **(BB4)**, **(BB7)** i **(BB8)**), w których znajduje się paragraf *Author contribution*) zostały zawarte w Załączniku nr 6.

4.3 Omówienie osiągnięcia naukowego

Celem, który przyświecał badaniom opisanym w cyklu publikacji **(BB1–BB10)**, wymienionych powyżej, było sprawdzenie jak struktura toru cząstki, rozumiana jako przestrzenny rozkład jonizacji, wpływa na odpowiedź napromienionych komórek oraz jaki wpływ na naprawę radiacyjnych uszkodzeń DNA ma jednoczesne napromienienie komórek cząstkami o różnej gęstości jonizacji. Przykładem gęsto jonizujących cząstek są cząstki alfa, które oddziałują z atomami ośrodka lokalnie wzdłuż swojego toru. Promieniowanie fotonowe charakteryzuje się małą gęstością jonizacji (jonizują ośrodek jednorodnie w dużej objętości).

Czy promieniowanie jonizujące różniące się gęstością jonizacji będzie prowadzić do wzmocnienia efektu jednoczesnego działania (synergia) i czy mechanizmem za to odpowiedzialnym jest indukcja kompleksowych uszkodzeń DNA? Odpowiedź na te pytania zarówno przybliży nas do zrozumienia mechanizmu uszkodzenia i naprawy DNA, jak i ma duże znaczenie w radioterapii pacjentów onkologicznych, gdzie promieniowanie jonizujące o różnej gęstości jonizacji (np. radioterapia fotonowa i protonowa) wykorzystywane jest do niszczenia komórek nowotworowych.

Kolejnym aspektem, który stanowił motywację do prowadzonych przeze mnie badań, była charakterystyka oddziaływania promieniowania z materiałem komórkowym w nanoskali i zaproponowanie parametrów innych niż używane dotychczas w radiobiologii i radioterapii (dawka, liniowy przekaz energii) do zdefiniowania prawdopodobieństwa powstania kompleksowego uszkodzenia DNA.

Badania opisane w niniejszym cyklu publikacji stanowią przyczynek do tworzenia nowych deskryptorów biologicznej skuteczności promieniowania jonizującego, uwzględniających lokalne depozyty energii. Wyróżniają się one podejściem holistycznym obejmującym wszystkie znane typy procesów, które mają wpływ na ostateczny efekt biologiczny. Ocena efektu biologicznego jest kluczowa zarówno w radioterapii (m.in. w optymalizacji technik napromienienia pacjenta), jak i ocenie skażenia w wypadkach radiacyjnych, gdzie selekcja i klasyfikacja (triage) poszkodowanych osób stanowi podstawę skutecznej i szybkiej pomocy. Omówione poniżej badania oddziaływania promieniowania jonizującego z komórkami ludzkimi zostały przeprowadzone z wykorzystaniem podejścia doświadczalnego i teoretycznego.

4.3.1 Wprowadzenie

Rys historyczny

Ślady oddziaływania cząstek jonizujących z materią są od dawna wykorzystywane w fizyce jądrowej. Analiza torów cząstek w emulsji poddanej ekspozycji na promieniowanie kosmiczne umożliwiła Marianowi Danyszowi i Jerzemu Pniewskiemu odkrycie pierwszego hiperjądra (Danysz and Pniewski, 1953). Charakterystyczny ślad zarejestrowany w emulsji fotograficznej wskazywał na rozpad nietrwałego fragmentu jądrowego, gdzie zamiast neutronu pojawiła się niedługo przedtem odkryta cząstka lambda. Odkrycie, że hiperony lambda mogą istnieć jako składniki jądra atomowego, miało ogromne znaczenie dla badań fizyki wysokich energii, a w szczególności dla grupy badawczej, którą Marian Danysz stworzył w warszawskim Instytucie Fizyki Doświadczalnej na Hożej do analizy oddziaływań cząstek wysokich energii.

Analogiczne mechanizmy oddziaływania służą nie tylko badaniom podstawowym. Cząstki o niższych energiach już wcześniej znalazły swoje zastosowanie w diagnostyce medycznej i terapii, dzięki

m.in. odkryciu promieniowania X przez Wilhelma Conrada Röntgena w 1895 roku (Röntgen, 1895). Maria Skłodowska-Curie wykorzystwała to promieniowanie w opracowanych przez siebie mobilnych aparatach rentgenowskich do planarnego obrazowania urazów układu kostnego żołnierzy walczących podczas I Wojny Światowej. Obrażenia, które pojawiły się u osób używających aparatów do diagnostyki radiologicznej, były dowodem na to, że promieniowanie jonizujące powoduje uszkodzenia w komórkach ludzkiego ciała.

Dotychczasowy stan wiedzy

Odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA jest procesem wieloetapowym i wysoce uporządkowanym (Wojcik and Harms-Ringdahl, 2019). W pierwszej kolejności następuje rozpoznanie uszkodzenia, po którym występuje natychmiast aktywacja złożonej kaskady sygnałów odpowiedzialnych za znalezienie uszkodzonego miejsca w jądrze komórkowym i aktywację odpowiedniego mechanizmu naprawy (Dantuma and van Attikum, 2016). Mimo że mechanizmy naprawy są poznane (nagroda Nobla z chemii w 2015 roku), to ciągle nie wiadomo, jak komórki reagują na uszkodzenia o różnym stopniu złożoności, w szczególności, gdy pęknięcia nici DNA są skupione w małej objętości jądra komórkowego. Takie skupione uszkodzenia DNA tworzą klastry, czyli obiekty przestrzenne, w których występują dwie lub więcej zmian w obrębie jednego lub dwóch skrętów nici DNA.

Promieniowanie jonizujące jest unikalnym narzędziem, które może posłużyć do uszkodzenia materiału genetycznego w ściśle kontrolowany sposób, kontrolować możemy zarówno czas ekspozycji na promieniowanie prowadzącej do indukcji uszkodzenia, jak i energię zdeponowaną w komórkach (co opisujemy za pomocą dawki, mierzonej w Gy). Charakterystyka promieniowania (ładunek, energia) i mechanizm jego oddziaływania z materią żywą jest głównym wyznacznikiem konsekwencji biologicznych tego oddziaływania (Goodhead, 2007). Uszkodzenia cząsteczki DNA, indukowane z użyciem promieniowania jonizującego, można podzielić na trzy główne rodzaje (Wojcik and Martin, 2014):

- pojedynczonicowe pęknięcia DNA (z ang. SSB, Single Strand Breaks),
- podwójnonicowe pęknięcia DNA (z ang. DSB, Double Strand Breaks),
- uszkodzenie zasad (z ang. BD, Base Damage).

Oddziaływanie promieniowania jonizującego z układem biologicznym odbywa się w trzech etapach: (i) procesy fizyczne (zachodzące nie dłużej niż kilka pikosekund), (ii) reakcje chemiczne (trwające około setek sekund) oraz (iii) procesy biologiczne (wczesne efekty występujące w ciągu kilku do kilkudziesięciu godzin po napromienieniu materiału komórkowego). Procesy fizyczne są pierwszym i najkrótszym etapem oddziaływania promieniowania jonizującego z systemami biologicznymi, ale determinują kompleksowość uszkodzeń, a tym samym odpowiedź komórkową. Odpowiedź ta zależy również od charakterystyki następujących po fazie fizycznej procesów chemicznych, w których biorą udział m.in. zjonizowane i wzbudzone cząsteczki wody oraz kaskady procesów biologicznych związanych z rozpoznaniem uszkodzenia oraz jego naprawą (Hall et al., 2006).

Jednym ze sposobów makroskopowego opisu oddziaływania promieniowania jonizującego z materią jest użycie liniowego przekazu energii (z ang. LET, Linear Energy Transfer), który określa ilościowo średnią energię zdeponowaną na jednostkę długości toru cząstki. Fotony wysokoenergetyczne są przykładem promieniowania słabo jonizującego, charakteryzującego się niskim LET. Oddziałują tylko elektromagnetycznie z elektronami atomów i mogą pokonywać duże odległości wewnątrz jądra komórkowego, zanim jakiś atom zostanie zjonizowany lub wzbudzony (Wojcik and Martin, 2014). Dla tego rodzaju promieniowania liczba aktów jonizacji na długości odcinka toru o rozmiarach porównywalnych z rozmiarem jądra komórkowego jest mała. Do promieniowania o wysokim LET zaliczamy m.in. wysokoenergetyczne jądra helu, czyli cząstki alfa, które zgodnie z wzorem Bethgo-Blocha tracą sukcesywnie swoją energię kinetyczną w wyniku jonizacji atomów ośrodka. Jeśli ośrodkiem jest jądro komórkowe, to gęsto jonizujące promieniowanie alfa powoduje głównie DSB skupione w małej objętości materiału genetycznego, co prowadzi do jego większej skuteczności w indukowaniu uszkodzeń DNA m.in. ze względu na przestrzenny rozkład aktów jonizacji.

Poziom uszkodzenia komórek zależy od dawki, ale jakość uszkodzenia zależy od LET. Gęsto jonizujące cząstki alfa są często wykorzystywane do badania związku między odpowiedzią komórkową

a LET w kontekście radioterapii protonowej. Charakterystyczny (zarówno dla protonów, jak i cząstek alfa) sposób deponowania energii, opisany krzywą Bragga, ma ogromne znaczenie dla precyzyjnego niszczenia komórek nowotworowych w guzie oraz ochrony tkanek prawidłowych. Jednocześnie fakt, że protony, cząstki alfa i cięższe cząstki naładowane jonizują wzdłuż swojego toru, stanowi utrudnienie w zapewnieniu jednorodności dawki w obszarze napromieniania.

Równoległe z podejściem eksperymentalnym rozkład trafień wewnątrz jądra i strukturę toru cząstki można obliczyć z dużą precyzją za pomocą narzędzi wykorzystujących metody MC (Incerti et al., 2018; Friedland et al., 2011; Nikjoo et al., 2001; Nikjoo and Girard, 2012). Tutaj wykorzystujemy wspomnianą wyżej unikalną cechę promieniowania jonizującego, jaką jest możliwość dokładnej estymacji liczby trafień na daną dawkę w określonej objętości w określonym czasie. Analiza struktury toru w podejściu MC opiera się na opisie „zdarzenia po zdarzeniu” procesów fizycznych, które zachodzą w wyniku oddziaływania promieniowania jonizującego z atomami ośrodka. Każdy rodzaj oddziaływania dla śledzonej cząstki jest opisany przez zdeponowaną energię i pozycję, w której zachodzi to oddziaływanie. Ponadto pośrednie akty oddziaływania promieniowania z mikrośrodowiskiem komórkowym można modelować jako ewolucję czasową rodników pojawiających się w wyniku radiolizy wody. Połączenie tych dwóch etapów pozwala na badanie uszkodzeń w obrębie cząsteczki DNA, jak również między różnymi chromosomami w jądrze komórkowym. Właściwa kwantyfikacja zjawisk fizycznych na poziomie nanometrycznym jest kluczowym początkowym krokiem w każdej próbie przewidywania biologicznej odpowiedzi na dane warunki napromieniania. Niezwykle ważne jest, żeby hipotezy dotyczące kompleksowości uszkodzeń były testowane z wykorzystaniem jednego systemu biologicznego, uzyskując wyniki zarówno radiobiologiczne, jak i czysto fizyczne dla tych samych lub co najmniej równoważnych parametrów napromieniania, co jest przedmiotem dyskusji wśród naukowców (Briden et al., 1999; O'Neill and Wardman, 2009; Conte et al., 2017; Rucinski et al., 2021).

Wyniki badań, przedstawione tutaj, zostały opisane w trzech podrozdziałach, odpowiadających poszczególnym etapom oddziaływania promieniowania jonizującego z systemem biologicznym. Badania dotyczące etapu fizycznego, który obejmuje bezpośrednie akty oddziaływania cząstki jonizującej z cząsteczką DNA, zostały omówione w podrozdziale 4.3.2. Prace naukowe dotyczące fazy chemicznej obejmującej oddziaływanie pośrednie, które odbywa się pomiędzy produktami radiolizy wody i materiałem genetycznym, rozpoczęliśmy niedawno. W związku z tym wyniki badań są w trakcie opracowywania i będą dopiero przygotowywane do publikacji. Mimo to dla kompletności opisu, krótka charakterystyka symulacji produkcji reaktywnych form tlenu, które są prowadzone w naszej grupie badawczej, znalazła się w podrozdziale 4.3.3. Ostatnim elementem procesu jest odpowiedź komórkowa, czyli faza biologiczna, która została zbadana na różne sposoby z wykorzystaniem testów radiobiologicznych i opisana szczegółowo w podrozdziale 4.3.4. Podrozdział 4.3.4 składa się z dwóch części: (A) opisu badań uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem fotonowym oraz (B) opisu badań poświęconych synergii wiązek mieszanych promieniowania X i alfa.

4.3.2 Faza fizyczna oddziaływania promieniowania jonizującego

Przy raportowaniu wyników eksperymentalnych często pomija się fakt, że parametr LET jest wielkością uśrednioną, co może nie wystarczyć do opisu stochastycznego charakteru działania promieniowania i jego skutków, zwłaszcza na poziomie subkomórkowym (nm). Zamiast stosować wartości średnie, warto rozważyć wielkości nanodozymetryczne, które dają wgląd w szczegóły jonizacji na poziomie nanometrycznym, a tym samym pozwalają na interpretację odpowiedzi komórkowej na działanie promieniowania jonizującego w kontekście uszkodzeń DNA. Liczba aktów jonizacji w objętości poszczególnych nukleotydów DNA jest głównym czynnikiem określającym względną biologiczną skuteczność (z ang. RBE, Relative Biological Effectiveness) promieniowania jonizującego. Na podstawie rozkładu przestrzennego aktów jonizacji można obliczyć prawdopodobieństwo letalnego uszkodzenia komórek (Conte et al., 2017), które jest bliższe opisowi zjawisk w nanoskali niż uśredniony parametr LET.

Fotony oddziałują z materią pośrednio wytwarzając dodatkowo naładowane jony oraz elektrony w procesie fotoelektrycznym, rozpraszaniu Comptonowskim i kreacji par. Dlatego też zarówno promieniowanie fotonowe, jak i wytworzone przez nie elektrony jonizują ośrodek w sposób jednorodny w całej

objętości. LET jest wielkością uśrednioną i dobrze opisuje oddziaływania kwantów gamma i elektronów z materia, ale dla ciężkich cząstek naładowanych (takich jak cząstki alfa) opis statystyczny jest niewystarczający. Dlatego ze względu na lokalny charakter oddziaływań należy rozważyć wielkości nanodozymetryczne w badaniu skutków biologicznych. Dla ciężkich cząstek naładowanych takie same dawki oznaczają duże różnice w dawkach lokalnych w pobliżu trajektorii i poza nią, czego nie obserwuje się w oddziaływaniu kwantów gamma i elektronów. Akty jonizacji, które są generowane stosunkowo rzadko w przestrzeni przez promieniowanie fotonowe i elektronowe, skutkują głównie uszkodzeniami SSB, a tylko przy wysokich dawkach promieniowania pojawiają się DSB. Dla promieniowania o wysokim LET (protony, cząstki alfa, ciężkie jony) nawet przy niewielkich dawkach pojawiają się liczne DSB.

Modelowanie struktury toru cząstki

Gęstość jonizacji ma znaczenie dla eksperymentów radiobiologicznych, gdzie działaniu promieniowania jonizującego poddawany jest materiał biologiczny, np. w postaci monowarstwy komórek wysianych na szalkach Petriego. Kompleksowość uszkodzeń DNA oraz rozkład dawki dostarczonej przez cząstki alfa do komórek czynią cząstki alfa interesującym przedmiotem badań radiobiologicznych. Dlatego celem badań opisanych w publikacji (**BB10**) było oszacowanie metodami MC poziomu niejednorodności dawki i jej niepewności dla czterech różnych układów eksperymentalnych, zawierających powierzchniowe źródło cząstek alfa — ^{241}Am . Wartości LET i RBE zależą od charakterystyki źródła, konfiguracji układu napromieniania, systemu biologicznego i punktu końcowego opisującego jego odpowiedź. Metody MC są pomocne nie tylko w charakteryzowaniu konfiguracji układu doświadczalnego, ale także w określaniu czynników wpływających na charakterystykę wiązki, dzięki czemu można uniknąć błędów w prawidłowym oszacowaniu dawki podczas prowadzonych eksperymentów, które są kosztowne i czasochłonne. Przeprowadzenie odpowiednich symulacji, z wykorzystaniem kodów PARTRAC (Friedland et al., 2011) i Geant4 (Agostinelli et al., 2003; Allison et al., 2006), miało na celu pokazanie znaczenia charakterystyki systemu napromieniania przy przedstawianiu wyników eksperymentów, zwłaszcza gdy efekty biologiczne są badane na poziomie molekularnym. Modelowane układy uwzględniały sytuacje, gdy komórki hodowane na płaskim dysku, były umieszczone nad powierzchniowym źródłem ^{241}Am , z cząstkami alfa przenikającymi z dołu, oraz gdy źródło ustawione było nad komórkami, czyli cząstki alfa docierały do komórek z góry. Ta ostatnia konfiguracja była symulowana z kolimatorem i bez kolimatora, a także z kolimatorem obrotowym. Konfiguracje zostały wybrane ze względu na warunki hodowlane komórek oraz specyfikę układów napromieniania materiału komórkowego wykorzystywanych w eksperymentach radiobiologicznych. Wykorzystanie kolimatora umożliwia otrzymanie wysokiej jednorodności rozkładu LET, przy jednoczesnym zmniejszeniu mocy dawki, podczas gdy jego brak skutkuje szerokimi rozkładami LET cząstek alfa. Korzystanie z kolimatora jest oczywiście korzystne przy badaniu zależności między LET i RBE. RBE przyjmuje wartości najwyższe przy LET równym około $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ (Barendsen, 1994) i gwałtownie spada wraz ze wzrostem LET. Na podstawie otrzymanych rozkładów LET, można oczekiwać, że mniejsze wartości RBE zostaną uzyskane w przypadku napromieniania cząstkami alfa bez użycia kolimatora w porównaniu ze skolimowanymi cząstkami alfa. Wynikiem naszych symulacji, wartym podkreślenia w kontekście planowania i wykonywania eksperymentów radiobiologicznych, jest niska jednorodność dawki w jądrach komórkowych napromienionych przy użyciu stacjonarnego kolimatora. Efekt ten wynika z wyeliminowania większości cząstek alfa, które opuszczają źródło pod kątem odbiegającym od 90° oraz z pochłaniania cząstek przez ścianki kolimatora. Jednorodność dawki można poprawić przez przesuwanie kolimatora (z ang. wobbling).

Nanodozymetria

Najskuteczniejszą metodą eksperymentalną stosowaną do zliczania liczby aktów jonizacji indukowanych przez cząstkę przechodzącą przez ośrodek w objętościach nanometrowych oraz badania jej przestrzennej i czasowej struktury toru jest nanodozymetria. Ta metoda wykorzystuje wysoce wyrafinowane systemy detekcji jonów, które powstają w objętości czynnej wypełnionej gazem pod niskim ciśnieniem. Badanie pojedynczych aktów jonizacji w rozrzedzonym gazie jest łatwiejsze niż analogiczny pomiar w gęstym ośrodku wodnym symulującym środowisko komórkowe. Objętość czynna gazu w nanodozymetrze jest odpowiednikiem cylindrycznej objętości obiektu biologicznego (obiektem może być np.

nić DNA). Ze względu na budowę cząsteczki DNA, często rozważa się 1-2 skręty nici o długości 10-20 par zasad (z ang. base pairs, bp)), gdzie odległość między bp wynosi około 0,34 nm. Wyniki nanodozymetrycznych pomiarów w gazie nie mogą być bezpośrednio zastosowane w układach biologicznych, dlatego potrzebna jest metoda interpretacji wyników otrzymanych w gazie w kontekście ciekłej wody symulującej strukturę subkomórkową. Żeby określić rozmiar struktury komórkowej, należy skorzystać z procedury skalowania pomiędzy gęstością powierzchniową gazu wykorzystanego podczas pomiaru nanodozymetrycznego i gęstością powierzchniową wody, opisaną wzorem poniżej:

$$(D\rho)^{(\text{woda})} = \eta \frac{(\lambda\rho)^{(\text{woda})}}{(\lambda\rho)^{(\text{gaz})}} (D\rho)^{(\text{gaz})} \cdot K_e,$$

gdzie η jest wydajnością rejestracji jonów w eksperymencie, $(D\rho)^{(\text{woda})}$ i $(D\rho)^{(\text{gaz})}$ to gęstości powierzchniowe objętości czynnej odpowiednio w wodzie i gazie, $(\lambda\rho)$ oznacza średnią długość drogi swobodnej cząstki pierwotnej w danym ośrodku, a K_e jest poprawką uwzględniającą różnicę w oddziaływaniu elektronów między ośrodkami ($K_e \approx 1$). Przykładowo, gęstość azotu w objętości czynnej nanodozymetru z Narodowego Centrum Badań Jądrowych równa $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ odpowiada 2 nm struktury subkomórkowej. Procedura skalowania jest dobrze ugruntowana i opisana w (Grosswendt, 2004). Nanodozymetry umożliwiają pomiary rozkładów wielkości klastrów jonizacyjnych, które powstają w wyniku przejścia cząstki przez ośrodek gazowy (z ang. ICSD, Ionisation Cluster Size Distributions) oraz określenie średniej wielkości takiego klastra (pierwszy moment rozkładu).

Dotychczas opracowano tylko cztery układy prototypowe nanodozymetru (Casiraghi et al., 2014; Bantsar et al., 2018), a jednym z nich jest Jet Counter (JC) zaprojektowany w Narodowym Centrum Badań Jądrowych. Szczegółowy opis konstrukcji i zasad działania JC znajduje się m.in. w (Pszona et al., 2000), a rozkłady ICSD otrzymane za pomocą JC i ich interpretacja w kontekście kompleksowości uszkodzeń DNA stanowią główny temat badań, opisanych w publikacji (BB9). Do pomiarów użyliśmy radioaktywnego źródła cząstek alfa (^{241}Am) o energii 4,6 MeV, która jest niższa od nominalnej energii 5,5 MeV ze względu na to, że cząstki alfa przed opuszczeniem źródła muszą pokonać warstwę źródła oraz złota, która pokrywa źródło. Kluczową nowością w tej pracy nie były jednak dane eksperymentalne, a symulacje ICSD wykonane z wykorzystaniem kodów Geant4-DNA (Incerti et al., 2018) bazujących na metodach MC. W pracy (BB9) po raz pierwszy określiliśmy ilościowo niepewność ICSD z uwzględnieniem:

- (i) trzech głównych modeli fizycznych Geant4-DNA przy użyciu przekrojów czynnych dla wody w stanie ciekłym,
- (ii) procedury skalowania jonizacji w gazie o niskim ciśnieniu do środowiska wodnego z wykorzystaniem kodów PTra (Kling et al., 2014) zawierających przekroje czynne na jonizacje dla cząstek alfa w azocie,
- (iii) wydajności ekstrakcji jonów oraz obecności pasywnych elementów detektora, tj. ściany Mylar,
- (iv) różnych rozmiarów objętości czynnej.

Na podstawie opisanych w publikacji wyników można stwierdzić, że niepewność określenia wydajności nanodozymetru JC wprowadza większe różnice pomiędzy ICSD uzyskanymi z symulacji Geant4-DNA oraz otrzymanymi eksperymentalnie niż uwzględnienie różnych modeli fizycznych. Potwierdza to zasadność dalszych prac w kierunku unowocześniania aparatury oraz proponowania nowych metod pomiarowych. Potwierdziliśmy również, że procedura skalowania gęstości zastosowana do symulacji Geant4-DNA ICSD w wodzie ciekłej umożliwia modelowanie wielkości nanoskopowych tak dokładnych, jak w symulacji PTra przeprowadzonej w gazowym azocie. Wykorzystując parametry ICSD, obliczyliśmy również wartość F_4 , czyli skumulowane prawdopodobieństwo utworzenia klastra o rozmiarze 4 lub większym. Założyliśmy, że parametr ten, który jest wielkością fizyczną, odpowiada prawdopodobieństwu wywołania kompleksowych, nieodwracalnych uszkodzeń DNA. Nasze wyniki wskazują, że przewidywanie ICSD i ich parametrów na podstawie symulacji Geant4-DNA jest precyzyjne, otwierając możliwość jego zastosowania do planowania leczenia w oparciu o wielkości nanodozymetryczne (Ramos-Méndez et al., 2018; Rucinski et al., 2021).

4.3.3 Wpływ fazy chemicznej na uszkodzenia radiacyjne

Nie tylko ilość energii zdeponowanej przez promieniowanie w jednostce masy (czyli dawka D) determinuje skutki biologiczne, ale również sposób, w jaki jest ona dostarczona do komórek (opisany przez moc dawki, czyli dD/dt). Pokazano, że zastosowanie promieniowania jonizującego o ultra wysokich mocach dawki, rzędu 500 Gy/s, poprawia ochronę tkanek zdrowych przy jednoczesnym niszczeniu komórek nowotworowych (terapia FLASH (Wilson et al., 2020)). Chociaż biologiczny mechanizm efektu FLASH nadal nie jest poznany, niedobór tlenu w środowisku komórkowym, który powstaje w wyniku reakcji radiolizy, wydaje się być jedną z prawdopodobnych hipotez (Labarbe et al., 2020). Większość symulacji komputerowych przeprowadza się w oparciu o założenie, że skład chemiczny jądra komórki można opisać jako czystą wodę w stanie ciekłym. Jest to zbyt duże uproszczenie ze względu na znaczenie reakcji chemicznych, które zachodzą w wyniku oddziaływania promieniowania jonizującego ze środowiskiem badanego ośrodka. W naszych badaniach, które są realizowane pod moją opieką we współpracy z naukowcami z Loma Linda University (USA), porównujemy obliczenia oparte na radiolizie czystej wody z modelami uwzględniającymi radiolizę środowiska wodnego, w którym obecne są cząsteczki DNA, RNA, białka i aminokwasy. Wdrożyliśmy dwa modele radiolizy wody z reakcjami chemicznymi tlenu i cząsteczek o znaczeniu biologicznym, które mogą pomóc w zrozumieniu efektu FLASH w tkankach zdrowych. Symulacje ewolucji czasowej stężeń powstałych rodników dla tych modeli zostały wykonane z wykorzystaniem kodów TOPAS-nBio (Schuemann et al., 2019). Wyniki symulacji pokazują, że stężenie tlenu w środowisku wodnym różni się od tego uzyskanego w środowisku komórkowym, co wynika z wprowadzenia w obu modelach konkurencyjnych zmiataczy, które reagują z wolnymi rodnikami. Dodatkowo, różnice w stężeniu tlenu widoczne są również, gdy porównujemy dwie techniki napromieniania: technikę FLASH o wysokiej mocy dawki równej 500 Gy/s i radioterapię konwencjonalną o niskiej mocy dawki równej 0,29 Gy/s. Uzyskane wyniki będą stanowiły treść manuskryptu, nad którym właśnie pracujemy. Niezależnie w ramach kolejnej pracy magisterskiej zostały zaplanowane pomiary stężeń H_2O_2 oraz O_2 w fantomach, dla których symulacje zostały przeprowadzone, i będą realizowane w ramach współpracy z Instytutem Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. Zmierzone przy użyciu chromatografii gazowej i miareczkowania stężenia produktów radiolizy zostaną wykorzystane do weryfikacji obliczeń wykonanych w programie Kinetiscope (Wiegel et al., 2015) w oparciu o metody MC.

4.3.4 Biologiczne konsekwencje działania promieniowania jonizującego

(A) Uszkodzenia DNA indukowane przez promieniowanie fotonowe

Źródłem promieniowania fotonowego może być zarówno lampa rentgenowska, która umożliwi produkcję promieniowania X, jak i radionuklidy (np. ^{137}Cs , ^{60}Co), które w wyniku przemian jądrowych emitują promieniowanie gamma. Promieniowanie fotonowe, przechodząc przez jądro komórkowe, jonizuje atomy w sposób jednorodny w całej objętości. Ze względu na charakter tego oddziaływania, uszkodzeniami, które powstaną w wyniku napromienienia materiału komórkowego, będą głównie SSB, choć przy wysokich dawkach promieniowania gamma pojawiają się uszkodzenia typu DSB.

Wielkość kolonii komórek, które przeżyły

Badanie przeżywalności komórek poddanych działaniu promieniowania jonizującego jest podstawową metodą określenia cytotoksycznego wpływu promieniowania i toksyn chemicznych. Jednym z ostatnich etapów przeprowadzenia tego testu jest policzenie kolonii (skupisk zawierających minimum 50 komórek), które powstały w wyniku podziału komórek, które przeżyły napromienianie. W dużych eksperymentach manualne liczenie kolonii jest czasochłonne i obciążone błędami, wynikającymi m.in. z braku doświadczenia osoby liczącej. Co więcej, często interesujące jest ilościowe określenie wielkości poszczególnych kolonii, które dotychczas nie było uwzględniane w analizie danych. Takie obliczenia są w dużej mierze wykonywane z wykorzystaniem komputerowych systemów analizy obrazu. Chociaż istnieje wiele takich systemów, wszystkie skupiają się na liczeniu kolonii, a nie na analizie wielkości

kolonii. Aby rozwiązać ten problem, opracowaliśmy nowy pakiet oprogramowania do liczenia kolonii oraz analizy rozkładu ich wielkości, opisany w (BB5). Oprogramowanie o nazwie countPHICS składa się z dwóch części:

1. narzędzia napisanego dla systemu przetwarzania obrazów ImageJ, umożliwiającego analizę obrazów zeskanowanych szalek Petriego, określenie liczebności kolonii na szalce, szacowanie ich wielkości (pola powierzchni zajmowane przez pojedyncze kolonie);
2. programu Plotting Histograms of Colony Size (PHICS) z graficznym interfejsem użytkownika wykorzystującym przenośne biblioteki Qt, który pozwala na wizualizację histogramów rozkładu wielkości kolonii na podstawie wyników otrzymanych w części pierwszej oraz sparametryzowanie tego rozkładu poprzez dopasowanie najlepszej funkcji (rozkład Gaussa lub Weibulla).

Aby przedstawić przykład zastosowania programu, do analizy wielkości kolonii (czyli zaproponowanego przeze mnie nowego parametru klonogenego testu przeżywalności) wykorzystaliśmy wyniki badań na linii niedrobnokomórkowego nowotworu płuc (Lundholm et al., 2014), dla której zaobserwowano zmniejszenie tempa wzrostu względem warunków kontrolnych, ale nie oznaczono go ilościowo. W cytowanej pracy macierzyste komórki nowotworowe płuc zostały poddane działaniu trzech czynników: promieniowanie gamma, kinaza białkowa aktywowana mitogenami (MEK; kiedy MEK jest hamowany, proliferacja komórek jest blokowana i indukowana jest apoptoza, czyli kontrolowana śmierć komórki) oraz kombinacja tych dwóch czynników. Na podstawie analizy danych w (BB5) przy użyciu oprogramowania countPHICS można było stwierdzić tendencję do zmniejszania wielkości kolonii dla komórek wstępnie potraktowanych inhibitorem MEK przed napromienieniem. To oznacza, że kolonie zostały zmniejszone nie tylko pod względem liczebności, ale także na poziomie tempa wzrostu (tj. wielkości kolonii).

Zmiana struktury chromatyny

Promieniowanie fotonowe powoduje indukcję pęknięć nici DNA jednorodnie w objętości materiału genetycznego upakowanego w jądrze komórkowym. Stopień upakowania chromatyny w jądrze komórkowym odgrywa rolę w kontroli ekspresji genów. Podczas gdy chromatyna znajdująca się w stanie gęstego upakowania (heterochromatyna) jest zazwyczaj nieaktywna genetycznie, mniej skondensowana euchromatyna jest genetycznie aktywna. Sposób upakowania chromatyny może również prowadzić do różnej skuteczności generowania uszkodzeń DNA przez promieniowanie jonizujące. W pracy (BB1) wykorzystaliśmy komórki macierzyste nowotworu płuc, żeby zbadać skuteczność inhibitorów deacetylazy histonowej, która jest odpowiedzialna za zmianę struktury chromatyny. Tak zmodyfikowane komórki zostały poddane działaniu promieniowania X i/lub cisplatyny, która jest wykorzystywana w chemioterapii pacjentów onkologicznych. Zarówno zmierzone krzywe przeżywalności, jak i rozkłady wielkości kolonii wskazują na niższą przeżywalność komórek oraz mniejsze rozmiary powstałych kolonii w sytuacji, gdy inhibitory kondensacji chromatyny zostały dodane do komórek 16 godzin przed napromienieniem. Na podstawie naszych wyników można sądzić, że w przeciwieństwie do euchromatyny, gdzie promieniowanie X wnika i indukuje uszkodzenia nici DNA, struktura heterochromatyczna (czyli gęsto upakowana) chroni głębsze warstwy materiału genetycznego i tym samym odgrywa rolę w oporności macierzystych komórek nowotworu płuc na radioterapię. Jest to szczególnie interesujące ze względu na fakt, że inhibitory są dostępne klinicznie, co oznacza, że możliwe jest ich wykorzystanie jako markera heterochromatycznego, a to z kolei umożliwiłoby personalizację schematu leczenia pacjenta onkologicznego.

(B) Synergia wiązek mieszanych

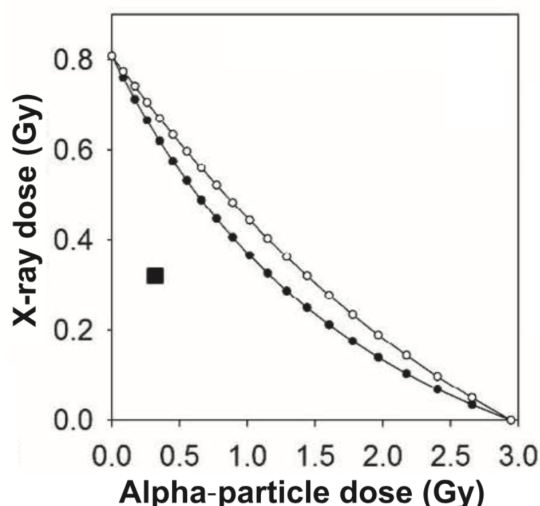
Promieniowanie jonizujące ze źródeł naturalnych najczęściej nie występuje w postaci emitera jednego rodzaju cząstek, np. rozpadowi alfa (czyli przemianie jądrowej z emisją cząstek alfa) i beta (czyli przemianie jądrowej z emisją elektronów/pozytonów) zwykle towarzyszy emisja kwantów gamma. Oddziaływanie wiązki protonowej, stosowanej w radioterapii protonowej, z elementami układu kolimacji

lub z ciałem pacjenta prowadzi do produkcji neutronów. Promieniowanie kosmiczne, na którego działanie jesteśmy narażeni podczas podróży samolotem, to głównie protony konwertowane na ciężkie jony w skorupie samolotu. Zasady ochrony radiologicznej są tworzone w oparciu o założenie, że całkowity efekt biologiczny pochodzący od różnych źródeł radioaktywnych jest sumą efektów od poszczególnych jego składników. Wyniki badań, których opis znajduje się w tym podrozdziale, pokazują, że odpowiedź komórek w wyniku ekspozycji na mieszane wiązki fotonów i cząstek alfa jest inna niż ta przewidziana w oparciu o założenie addytywności.

Ogniska naprawcze 53BP1

Podczas gdy w klonogennym teście przeżywalności skuteczność promieniowania jonizującego badana jest na poziomie komórkowym, obserwacja ognisk naprawczych jest możliwa w skali submikrometrowej. Ogniska naprawcze pojawiają się w cząsteczce DNA w miejscu powstania DSB, którego rozpoznanie rozpoczyna mechanizm naprawy radiacyjnego uszkodzenia m.in. przez rekrutację odpowiednich białek naprawczych (w opisanych poniżej badaniach jest to białko 53BP1). Miejsce kumulacji tych białek w połączeniu z białkiem zielonej fluorescencji jest widoczne pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Badanie ognisk naprawczych 53BP1 wykorzystaliśmy w pracy (BB2) i (BB3), żeby odpowiedzieć na pytanie, czy ich indukcja wywołana ekspozycją komórek na promieniowanie o różnym LET (około $1,5 \text{ keV}/\mu\text{m}$ dla promieniowania X i $100\text{--}172 \text{ keV}/\mu\text{m}$ dla promieniowania alfa) wynika z addytywności czy z synergii oddziaływania obu typów promieniowania. W tym celu komórki nowotworowe kostniakomięsaka zostały napromienione cząstkami alfa, promieniowaniem X oraz ich kombinacją, czyli wiązkami mieszanymi (50% dawki całkowitej pochodzącej od promieniowania alfa i 50% dawki całkowitej — od promieniowania X). Zaobserwowaliśmy jakościowe różnice w indukcji ognisk naprawczych: podczas gdy ogniska wywołane fotonami są małe, większość ognisk indukowanych przez cząstki alfa jest duża. Badanie synergii oddziaływania promieniowania X i alfa było możliwe dzięki obliczeniu kopert addytywności dla wybranych efektów biologicznych, np. indukcji 10 małych ognisk w jądrze komórkowym, co zostało pokazane na Rys. 1.



Rysunek 1: Przykładowa koperta addytywności (BB2). Krawędzie kopert (na rysunku to punkty oznaczone jako pełne i puste kółka) odpowiadają dwóm izobologramom utworzonym dla heteroadytywnej i izoadytywnej formy oddziaływania między badanymi dwoma rodzajami promieniowania. Izoaddytywna odpowiedź (kółka puste) jest liczona w oparciu o założenie, że promieniowanie X i alfa mają ten sam mechanizm działania i łączny efekt jest superaddytywny. Odpowiedź heteroadytywna (kółka pełne) jest obliczana w oparciu o założenie, że oba rodzaje promieniowania mają inny mechanizm działania, ale łączny efekt jest addytywny. Jeśli dane pochodzące z eksperymentu, w którym wykorzystane zostały wiązki mieszane (na rysunku punkt w kształcie kwadratu) znajdują się wewnątrz obwiedni koperty addytywności, to oznacza, że mamy do czynienia z efektem addytywnym. Jeśli dane znajdują się na zewnątrz obwiedni, efekt jest albo synergistyczny (punkt znajdujący się na lewo od koperty), albo antagonistyczny (na prawo od koperty).

W pracy (**BB2**) koperty addytywności zostały obliczone na podstawie krzywych odpowiedzi (czyli częstości występowania ognisk w funkcji dawki) dla trzech scenariuszy napromienienia i wyniki jednoznacznie pokazały, że indukcja ognisk przez wiązki mieszane jest efektem synergii, a nie addytywności, jak jest przyjęte w ochronie radiologicznej.

Ponadto, w pracy (**BB3**) zajęliśmy się badaniem kinetyki powstawania i naprawy tych ognisk. Zachowanie małych i dużych ognisk różni się: małe ogniska pojawiają się i znikają szybko, podczas gdy duże ogniska formują się i znikają powoli. Wyniki tłumaczą założenie, że kompleksowe lub skupione w małej objętości uszkodzenia DNA stanowią dla komórki poważny problem w procesie naprawy DNA. Naprawa ognisk, które powstają w wyniku działania wiązek mieszanych, przebiega najwolniej w porównaniu z zanikiem ognisk indukowanych niezależnie promieniowaniem X i cząstkami alfa. Użycie mikroskopu fluorescencyjnego do obrazowania w czasie rzeczywistym umożliwiło obserwację przemieszczania się ognisk w obrębie jądra komórkowego oraz obliczenie ich średniego kwadratowego przemieszczenia (z ang. MSD, Mean Square Displacement) w formalizmie ruchów Browna. Nasze wyniki sugerują, że ogniska indukowane wiązkami mieszanymi wykazują niski stopień ruchliwości, prawdopodobnie przyczyniając się do zwiększonej błędnej naprawy uszkodzeń, zwłaszcza w skupiskach DSB. Wyniki te potwierdzają naszą wcześniejszą obserwację wysokiej częstości kompleksowych aberracji chromosomowych w komórkach narażonych na działanie wiązek mieszanych.

Aberracje chromosomowe: eksperyment i modelowanie

Ocena dawki odgrywa ważną rolę w wypadkach radiacyjnych i może być przeprowadzana poprzez ocenę zmian strukturalnych morfologii chromosomów (aberracje chromosomowe) wywołanych w komórkach promieniowaniem jonizującym. Celem pracy (**BB8**) była analiza porównawcza opublikowanych wyników eksperymentalnych dotyczących indukcji aberracji chromosomowych w ludzkich limfocytach krwi obwodowej poddanych działaniu mieszanych wiązek cząstek alfa i promieniowania rentgenowskiego z symulacjami komputerowymi z wykorzystaniem programu PARTRAC opartego na metodach MC. Zaletą symulacji w stosunku do badań eksperymentalnych jest brak potencjalnie mylącego wpływu na uzyskany wynik czynników środowiskowych (wahania temperatury, kwasowość) oraz czynników takich jak wydajność i powtarzalność procesu zliczania wyników. Kody PARTRAC zostały wykorzystane do symulacji uszkodzeń DNA w postaci SSB i DSB (zarówno złożonych, jak i pojedynczych) oraz liczby aberracji chromosomowych, które w wyniku tych uszkodzeń powstały. Zależność SSB i DSB od dawki różni się dla promieniowania X (indukowana jest większa liczba SSB niż DSB) i dla cząstek alfa, które ze względu na gęstą jonizację indukują więcej DSB niż SSB. Całkowita liczba SSB i DSB wywołanych wiązkami mieszanymi jest efektem addytywnym, czyli sumą SSB i DSB pochodzących od fotonów i cząstek alfa. Sytuacja jest jednak inna na poziomie aberracji chromosomowych, gdzie symulacje wskazują efekt synergiczny, co jest zgodne z wynikami eksperymentalnymi. Wynik ten pokazuje, że synergiczne działanie mieszanych wiązek wynika z tego, jak komórka radzi sobie z naprawą SSB i DSB (faza biologiczna). Stosując kody PARTRAC, sprawdziliśmy, czy występowanie efektu synergicznego zależy od proporcji promieniowania alfa i promieniowania X. Poziom synergii zależał od składu wiązek mieszanych, przy czym najwyższy jego poziom był obserwowany przy stosunku dawki 50:50 cząstek alfa do promieniowania rentgenowskiego.

W przeciwieństwie do klasyfikacji aberracji chromosomowych, które są modelowane w oparciu o metody MC, zliczanie aberracji chromosomowych w eksperymencie jest trudne dla osoby, która nie ma doświadczenia w analizie mikroskopowej materiału biologicznego. Potwierdzają to wyniki naszych badań, opisane w (**BB6**). W sytuacji gdy potrzebna jest szybka analiza dużej ilości danych (np. po wypadku radiacyjnym), zaleca się stosowanie prostych do nauczenia się testów radiobiologicznych. Dlatego postanowiliśmy porównać wydajności dwóch testów radiobiologicznych: aberracji chromosomowych i testu mikrojądrowego. Każdy uczestnik dwutygodniowego kursu radiobiologii, finansowanego przez UE i organizowanego na Uniwersytecie w Sztokholmie, został poproszony o ocenę uszkodzeń cytogenetycznych komórek jajnika chomika chińskiego poddanych działaniu promieniowania gamma w zakresie 0-4 Gy. Analiza porównawcza wyników testów otrzymanych przez osoby niedoświadczone (studentów) z wartościami referencyjnymi wygenerowanymi przez eksperta (doświadczony cytogenetyk) została przeprowadzona dla każdej dawki oraz dla parametrów dopasowania krzywej dawka-odpowiedź pomiędzy studentami. Test mikrojądrowy był zwykle szybszy i łatwiejszy do nauczenia niż ocenianie

aberracji chromosomowych. Jednak oba testy przeprowadzone przez niedoświadczonych studentów wykazały rozsądne zależności liczby aberracji chromosomowych i mikrojąder w funkcji dawki. W przypadku dużego wypadku radiologicznego z wieloma ofiarami, nawet osoby z małym doświadczeniem mogłyby wspierać proces selekcji i klasyfikacji poszkodowanych za pomocą cytogenetycznej dozymetrii biologicznej.

Limfocyty krwi obwodowej

Jeśli chodzi o stosowanie dozymetrii biologicznej w wypadkach radiacyjnych, materiałem komórkowym, który pobiera się od osób poszkodowanych, są limfocyty krwi obwodowej (z ang. PBL, Peripheral Blood Lymphocytes). Ze względu na to, że podczas wypadku ludzie są narażeni na promieniowanie mieszane, celem badania przeprowadzonego na ludzkich PBL, opisanego w (BB4), było przyjrzenie się mechanizmowi interakcji, zwłaszcza w odniesieniu do pytania, czy wynika ona ze zwiększonego poziomu początkowego uszkodzenia czy upośledzonej naprawy DNA. PBL zostały poddane działaniu cząstek alfa, promieniowania rentgenowskiego i wiązek mieszanych z wykorzystaniem różnych wartości dawek. Uszkodzenie DNA i kinetyka naprawy uszkodzeń została określona ilościowo za pomocą alkalicznego testu kometowego wykorzystującego metodę elektroforezy. Poziomy fosforylowanych, kluczowych białek odpowiedzi na uszkodzenia DNA (z ang. DDR, DNA Damage Response): ATM, p53 i DNA-PK zostały zmierzone metodą Western blot, a poziomy mRNA sześciu wybranych genów, aktywnych w przypadku uszkodzenia DNA — metodą RT-qPCR (z ang. real time quantitative polymerase chain reaction). Wyniki badań wskazują, że cząstki alfa i promieniowanie rentgenowskie oddziałują z materiałem komórkowym, wywołując uszkodzenia DNA powyżej poziomu przewidywanego przy założeniu addytywności, a naprawa uszkodzeń następuje z opóźnieniem. Poziomy aktywacji białek DDR i poziomy mRNA badanych genów były najwyższe w komórkach narażonych na wiązki mieszane. To potwierdza, że wystawienie PBL na działanie wiązek mieszanych stanowi wyzwanie dla komórkowego systemu DDR. Dodatkowym dowodem wskazującym na efekt synergiczny w PBL narażonych na działanie promieniowania mieszane, składającego się z cząstek alfa i promieniowania rentgenowskiego, była rozszerzona analiza odpowiedzi genetycznej opisana w (BB7). W tym badaniu została zastosowana metoda qPCR do pomiaru poziomów mRNA FDXR, GADD45A, BBC3, MDM2, CDKN1A i XPC 24 godziny po napromienieniu. Cząstki alfa i wiązki mieszane silniej indukowały ekspresję genów w porównaniu z promieniowaniem X, co było widoczne na podstawie krzywej odpowiedzi w funkcji dawki. W trzech na czterech próbkach krwi pobranych od badanych dawców (zdrowi, nie palący papierosów mężczyźni) zaobserwowaliśmy efekt synergii na mieszane wiązki promieniowania. Gdy rok później ponownie zostały pobrane próbki od dwóch dawców, poprzedni efekt addytywny u jednego dawcy był teraz synergiczny. Ponadto na podstawie testu mikrojądrowego wykonanego z wykorzystaniem PBL poddanych działaniu promieniowania gamma żadna znacząca różnica w wewnętrznej wrażliwości na promieniowanie nie została zaobserwowana. Podsumowując, synergia była obecna u wszystkich dawców, ale wyniki sugerują indywidualną zmienność wynikającą z czynników związanych ze stylem życia.

4.3.5 Podsumowanie

Stanowiący podstawę niniejszej pracy, spójny ciąg badań umożliwił pogłębienie zrozumienia procesów i mechanizmów oddziaływania promieniowania jonizującego z systemami biologicznymi. Zrozumienie tych zagadnień jest kluczowe dla skutecznej oceny zagrożeń spowodowanych napromienieniem ofiar wypadków radiacyjnych oraz dla efektywnego planowania radioterapii.

Popularnym testem badania odpowiedzi komórkowej na działanie promieniowania jonizującego jest klonogenny test przeżywalności, oparty na określaniu liczby kolonii, powstałych w wyniku podziału komórek, które przeżyły napromienienie. Nie jest to wystarczające do oceny kompleksowości uszkodzeń, dlatego w pracy (BB5) zaproponowano rozszerzenie tego testu o ocenę wielkości kolonii, dzięki której możemy określić nie tylko jak dużo uszkodzeń powstało, ale również ich jakość, która wpływa na efektywność radioterapii pacjentów onkologicznych.

Dla podniesienia efektywności indukcji uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem fotonowym, stosowanym w radioterapii konwencjonalnej, w pracy (BB1) zastosowano inhibitory kondensacji chromatyny. Dzięki modyfikacji upakowania chromatyny w jądrze komórkowym, zmienił się rozkład prze-

strzeny aktów jonizacji, a co za tym idzie zwiększyła się liczba uszkodzeń DNA, co ma kluczowe znaczenie w skuteczności zabijania komórek nowotworowych u pacjentów gorzej reagujących na leczenie radioterapeutyczne.

Efekt, który nie był do końca wyjaśniony i był motywacją kolejnych badań, to kwestia synergicznej odpowiedzi komórkowej na dawki promieniowania mieszanego, w szczególności promieniowania fotonowego o niskiej gęstości jonizacji podanego jednocześnie z gęsto jonizującymi cząstkami alfa. W pracach (**BB2**), (**BB3**), (**BB4**), (**BB7**) oraz (**BB8**) pokazano eksperymentalne wyniki potwierdzające, że zbadane efekty biologiczne nie wynikają z addytywnego działania obu rodzajów promieniowania. Wyniki te mają kluczowe znaczenie w określaniu dawki zarówno podczas oceny narażenia ofiar wypadków radiacyjnych, w których zawsze mamy do czynienia z promieniowaniem mieszanym, jak i w systemach planowania radioterapii, w którym znajomość nieliniowego sumowania efektów pozwala na optymalizację radioterapeutycznego leczenia pacjentów onkologicznych.

Nieliniowość ta wynika ze specyficznego mechanizmu indukcji kompleksowych uszkodzeń DNA, co pokazano w pracach (**BB8**) i (**BB10**) za pomocą symulacji MC. Wykazano, że efektywność promieniowania zależy bezpośrednio nie tylko od liczby indukowanych uszkodzeń materiału genetycznego, ale też ich struktury przestrzennej. Liczba pojedynczoniowych i podwójnioniowych pęknięć łańcucha DNA zależy od przestrzennego rozkładu aktów jonizacji, który z kolei wynika ze struktury torów cząstek emitowanych z radioaktywnego źródła. Sumaryczne wyniki tych prac pozwoliły też na oszacowanie liczby SSB, DSB oraz rozkładów wartości LET.

Na podstawie informacji przestrzennych o rozkładzie SSB i DSB w pracy (**BB8**) za pomocą metod MC określono liczbę aberracji chromosomowych, które powstają w wyniku błędnej naprawy SSB i DSB. Eksperymentalna detekcja wspomnianych aberracji chromosomowych jest trudną procedurą i obarczoną błędem zależnym m.in. od doświadczenia osoby wykonującej ten test. Z drugiej strony procedura ta jest kluczowa w ocenie dawki, którą otrzymały ofiary wypadków radiacyjnych. Dlatego w pracy (**BB6**) porównano test aberracji chromosomowych z innym testem radiobiologicznym — testem mikrojądrowym. Wyniki tego porównania jednoznacznie wskazały, że rozpoznawanie aberracji chromosomowych w próbkach biologicznych jest trudne, ale jednocześnie oszacowanie zależności liczby aberracji od dawki przez niedoświadczone osoby po dwutygodniowym kursie jest wystarczające w ocenie narażenia ofiar wypadków radiacyjnych, kiedy kluczowym parametrem jest czas.

Badanie podstawowych procesów fizycznych powodujących jonizację atomów ośrodka wywołujących kaskadę sygnałów odpowiedzi komórkowej na działanie promieniowania jonizującego, zawarte w pracy (**BB9**), wieńczy spójny ciąg publikacji, stanowiący podstawę postępowania habilitacyjnego. Najbardziej szczegółowy opis fizycznych procesów prowadzących do opisanych powyżej efektów biologicznych możliwy jest w nanoskali, za pośrednictwem symulacji MC i unikalnych pomiarów nanodozymetrycznych. Dzięki połączeniu wyników tych dwóch podejść, w pracy (**BB9**) zaproponowano nowy deskryptor, który uwzględnia lokalne depozyty energii i w dokładniejszy sposób niż parametr LET opisuje stochastyczny charakter oddziaływania promieniowania z żywymi komórkami. Nanodozymetryczna charakterystyka struktury toru cząstki ma nie tylko znaczenie poznawcze. Zaproponowane w pracy (**BB9**) nanodozymetryczne parametry stanowią podstawę dokładniejszego opisu mechanizmu uszkodzenia i naprawy DNA, co otwiera drogę do znaczącej poprawy oceny dawki, niezbędnej zarówno w ochronie radiologicznej, jak i w planowaniu radioterapii.

Literatura

- S Agostinelli, J Allison, K Amako, J Apostolakis, H Araujo, P Arce, M Asai, D Axen, S Banerjee, GJN Barrand, et al. Geant4—a simulation toolkit. *Nuclear instruments and methods in physics research section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 506(3):250–303, 2003.
- J Allison, K Amako, JEA Apostolakis, HAAH Araujo, PA Dubois, MAAM Asai, GABG Barrand, RACR Capra, SACS Chauvie, RACR Chytracsek, et al. Geant4 developments and applications. *IEEE Transactions on nuclear science*, 53(1):270–278, 2006.
- A Bantsar, P Colautti, V Conte, G Hilgers, M Pietrzak, S Pszona, H Rabus, and A Selva. State of the

- art of instrumentation in experimental nanodosimetry. *Radiation Protection Dosimetry*, 180(1-4):177–181, 2018. ISSN 17423406. doi: 10.1093/RPD/NCX263.
- GW Barendsen. The relationships between rbe and let for different types of lethal damage in mammalian cells: biophysical and molecular mechanisms. *Radiation Research*, 139(3):257–270, 1994.
- PE Briden, PD Holt, and JA Simmons. The track structures of ionizing particles and their application to radiation biophysics. *Radiation and Environmental Biophysics*, 38(3):175–184, 09 1999. doi: 10.1007/s004110050153. URL <https://doi.org/10.1007/s004110050153>.
- M Casiraghi, V Bashkirov, F Hurley, and R Schulte. A novel approach to study radiation track structure with nanometer-equivalent resolution. *The European Physical Journal D*, 68(5):111, 2014. ISSN 1434-6079. doi: 10.1140/epjd/e2014-40841-0. URL <https://doi.org/10.1140/epjd/e2014-40841-0>.
- V Conte, A Selva, P Colautti, G Hilgers, H Rabus, A Bantsar, M Pietrzak, and S Pszona. NANODOSIMETRY: TOWARDS A NEW CONCEPT OF RADIATION QUALITY. *Radiation Protection Dosimetry*, 180(1-4):150–156, 09 2017. ISSN 0144-8420. doi: 10.1093/rpd/ncx175. URL <https://doi.org/10.1093/rpd/ncx175>.
- NP Dantuma and H van Attikum. Spatiotemporal regulation of posttranslational modifications in the dna damage response. *The EMBO Journal*, 35(1):6–23, 2016. doi: <https://doi.org/10.15252/embj.201592595>. URL <https://www.embopress.org/doi/abs/10.15252/embj.201592595>.
- M Danysz and J Pniewski. Delayed disintegration of a heavy nuclear fragment: I. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 44(350):348–350, 1953.
- W Friedland, M Dingfelder, P Kunderát, and P Jacob. Track structures, dna targets and radiation effects in the biophysical monte carlo simulation code partrac. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1):28–40, 2011. ISSN 0027-5107. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.01.003>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510711000194>. From chemistry of DNA damage to repair and biological significance. Comprehending the future.
- DT Goodhead. Energy deposition stochastics and track structure: what about the target? *Radiation Protection Dosimetry*, 122(1-4):3–15, 02 2007. ISSN 0144-8420. doi: 10.1093/rpd/ncl498. URL <https://doi.org/10.1093/rpd/ncl498>.
- B Grosswendt. Recent advances of nanodosimetry. *Radiation Protection Dosimetry*, 110(1-4):789–799, 2004. ISSN 01448420. doi: 10.1093/rpd/nch171.
- Eric J Hall, Amato J Giaccia, et al. *Radiobiology for the Radiologist*, volume 6. Philadelphia, 2006.
- S Incerti, I Kyriakou, MA Bernal, MC Bordage, Z Francis, S Guatelli, V Ivanchenko, M Karamitros, N Lampe, SB Lee, S Meylan, CH Min, WG Shin, P Nieminen, D Sakata, N Tang, C Villagrasa, HN Tran, and JMC Brown. Geant4-dna example applications for track structure simulations in liquid water: A report from the geant4-dna project. *Medical Physics*, 45(8):e722–e739, 2018. doi: <https://doi.org/10.1002/mp.13048>. URL <https://aapm.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mp.13048>.
- Andreas Kling, Fernando JC Barao, Masayuki Nakagawa, Luis Tavora, and Pedro Vaz. *Advanced Monte Carlo for Radiation Physics, Particle Transport Simulation and Applications: Proceedings of the Monte Carlo 2000 Conference, Lisbon, 23–26 October 2000*. Springer Science & Business Media, 2014.
- Rudi Labarbe, Lucian Hotoiu, Julie Barbier, and Vincent Favaudon. A physicochemical model of reaction kinetics supports peroxy radical recombination as the main determinant of the flash effect. *Radiotherapy and Oncology*, 153:303–310, 2020.

- L Lundholm, P Hååg, T Juntti, R Lewensohn, and K Viktorsson. Phosphoprotein analysis reveals mek inhibition as a way to target non-small cell lung cancer tumor initiating cells. *International Journal of Radiation Biology*, 90(8):718–726, 2014. doi: 10.3109/09553002.2014.905725. URL <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.905725>.
- H Nikjoo and P Girard. A model of the cell nucleus for dna damage calculations. *International Journal of Radiation Biology*, 88(1-2):87–97, 2012.
- H Nikjoo, P O’Neill, WE Wilson, and DT Goodhead. Computational approach for determining the spectrum of dna damage induced by ionizing radiation. *Radiation Research*, 156(5):577–583, 2001.
- P O’Neill and P Wardman. Radiation chemistry comes before radiation biology. *International Journal of Radiation Biology*, 85(1):9–25, 2009. doi: 10.1080/09553000802640401. URL <https://doi.org/10.1080/09553000802640401>. PMID: 19205982.
- S Pszona, J Kula, and S Marjanska. New method for measuring ion clusters produced by charged particles in nanometre track sections of DNA size. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 447(3):601–607, 2000. ISSN 01689002. doi: 10.1016/S0168-9002(99)01191-2.
- J Ramos-Méndez, L N Burigo, R Schulte, C Chuang, and B Faddegon. Fast calculation of nanodosimetric quantities in treatment planning of proton and ion therapy. *Physics in Medicine & Biology*, 63(23):235015, 2018.
- WC Röntgen. Über eine neue art von strahlen. sitzungsberichte der physik.-med. *Gesellschaft zu Würzburg*, 137:132–141, 1895.
- A Rucinski, A Biernacka, and R Schulte. Applications of nanodosimetry in particle therapy planning and beyond. *Physics in Medicine & Biology*, 66(24):24TR01, dec 2021. doi: 10.1088/1361-6560/ac35f1. URL <https://dx.doi.org/10.1088/1361-6560/ac35f1>.
- J Schuemann, AL McNamara, J Ramos-Méndez, J Perl, KD Held, H Paganetti, S Incerti, and B Faddegon. Topas-nbio: an extension to the topas simulation toolkit for cellular and sub-cellular radiobiology. *Radiation Research*, 191(2):125–138, 2019.
- AA Wiegel, KR Wilson, WD Hinsberg, and FA Houle. Stochastic methods for aerosol chemistry: a compact molecular description of functionalization and fragmentation in the heterogeneous oxidation of squalane aerosol by oh radicals. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17:4398–4411, 2015. doi: 10.1039/C4CP04927F. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C4CP04927F>.
- JD Wilson, EM Hammond, GS Higgins, and K Petersson. Ultra-high dose rate (flash) radiotherapy: silver bullet or fool’s gold? *Frontiers in Oncology*, 9:1563, 2020.
- A Wojcik and M Harms-Ringdahl. Radiation protection biology then and now. *International Journal of Radiation Biology*, 95(7):841–850, 2019.
- A Wojcik and CJ Martin. Biological effects of ionizing radiation. In *Practical Radiation Protection in Healthcare*. Oxford University Press, 12 2014. ISBN 9780199655212. doi: 10.1093/med/9780199655212.003.0003. URL <https://doi.org/10.1093/med/9780199655212.003.0003>.

5 Aktywność naukowa

5.1 Fizyka Medyczna na Wydziale Fizyki UW

Kiedy rozpoczynałam pracę na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego w 2011 roku, dwoma najważniejszymi z postawionych przede mną zadań była opieka nad studentami I i II stopnia specjalności fizyka medyczna (FM) oraz stworzenie grupy badawczej, która podjęłaby po raz pierwszy

w Uniwersytecie Warszawskim badania z tego zakresu. Dodatkowym utrudnieniem był fakt zmiany tematyki badań, ponieważ w ramach projektu doktorskiego zajmowałam się nieelastycznym rozpraszaniem elektronów na protonach, czyli fizyką wysokich energii. W Uniwersytecie Warszawskim nie było wtedy samodzielnie prowadzonych badań z zakresu fizyki medycznej, co jest niezbędne do nadawania tytułów w tej dziedzinie. Dzięki wsparciu dr. hab. Zygmunta Szeplińskiego i prof. Piotra Durki (ówczesnego kierownika Zakładu Fizyki Biomedycznej) w pierwszych latach pracy na stanowisku adiunkta udało mi się nawiązać współpracę z jednostkami klinicznymi w Warszawie, gdzie studenci mogli realizować praktyki zawodowe i prace dyplomowe. To również dr hab. Zygmunt Szepliński skontaktował mnie w 2015 roku z prof. Andrzejem Wójcikiem z Departamentu Biologii Molekularnej na Uniwersytecie w Sztokholmie, gdzie spędziłam 1,5 roczny staż podoktorski. Prof. Wójcik nauczył mnie metod stosowanych w badaniach radiobiologicznych oraz umożliwił mi wyjazd do dr. Wernera Friedlanda, ojca kodów PARTRAC, podczas którego opanowałam podstawy symulacji oddziaływania promieniowania jonizującego z materiałem biologicznym w oparciu o metody MC. Doświadczenie w wykonywaniu symulacji, które zdobyłam podczas realizowania projektu doktorskiego, umożliwiło mi szybkie opanowanie posługiwania się kodami PARTRAC. Niewątpliwie mój staż na Uniwersytecie w Sztokholmie był motywacją, żeby oprócz eksperymentów *in silico*, które stały się tematem moich badań po powrocie na Wydział Fizyki, stworzyć przestrzeń do prowadzenia eksperymentów *in vitro*. Dlatego pierwsze lata poświęciłam — poza tworzeniem i konsolidowaniem grupy badawczej — na opisaną w podrozdziale 6.2.1 budowę zaplecza eksperymentalnego, obejmującego laboratorium radiobiologiczne oraz pracownię izotopową klasy Z i pracownię rentgenowską. Od 2019 roku w stworzonym przeze mnie laboratorium radiobiologicznym na Wydziale Fizyki rozpoczęliśmy badania uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem jonizującym. Oprócz prac licencjackich i magisterskich, rozpoczęliśmy kilka projektów doktorskich, w których pełnię funkcję promotora pomocniczego, i tym samym powstała grupa badawcza, która w większym lub mniejszym stopniu kontynuuje badania, które prezentuję w autoreferacie. Opisanie powyżej okoliczności wymusiły na mnie stosunkowo szybkie przejście do etapu, kiedy podstawą mojej działalności stała się koordynacja badań nowo powstałej grupy naukowej oraz promocja wkraczających w dziedzinę młodych naukowców (niemal wyłącznie moich magistrantów i doktorantów), co widać w listach autorów części opisywanych publikacji, w których moje nazwisko znajduje się często na ostatniej pozycji, zwyczajowo należnej PI (z ang. Principal Investigator). Obecnie w skład grupy prowadzonej przeze mnie wchodzi sześć doktorantów (dwoje z nich właśnie kończy spisywać rozprawę) oraz dwoje studentów Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych Uniwersytetu Warszawskiego.

Moje zaangażowanie w prace naukowe zostało docenione przez Władze Uniwersytetu Warszawskiego w postaci nagrody indywidualnej II stopnia Rektora Uniwersytetu Warszawskiego w 2021 oraz wyróżnieniem Rektora UW za osiągnięcia mające wpływ na rozwój i wzrost prestiżu Uniwersytetu Warszawskiego w 2022 roku.

5.2 Uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem o różnych LET

Doświadczenie w badaniu radiacyjnych uszkodzeń DNA z wykorzystaniem zarówno testów radiobiologicznych, jak i symulacji komputerowych wykorzystuję w opiece nad projektami doktorskimi prowadzonymi w naszej grupie.

Adrianna Tartas, która realizuje projekt doktorski w naszej grupie, zajęła się analizą ognisk naprawczych NBS1 (białko, którego ekspresja pojawia się podczas rozpoczęcia mechanizmu naprawy uszkodzenia DNA wcześniej niż badane przeze mnie białko 53BP1) w komórkach kostniakomięsaka. Dzięki zaproszeniu prof. Wójcika część eksperymentalna mogła zostać zrealizowana z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego do obrazowania w czasie rzeczywistym (z ang. live imaging) na Uniwersytecie w Sztokholmie. W 2022 roku wyposażyliśmy nasze laboratorium w mikroskop fluorescencyjny do obrazowania w czasie rzeczywistym. Aparatura ta umożliwi dalszy rozwój badań radiobiologicznych na Wydziale Fizyki, a dodatkowo podniesie jakość programu dydaktycznego fizyki medycznej.

Ze względu na to, że struktura toru cząstki ma ogromne znaczenie dla odpowiedzi napromienionych komórek, nasz kolejny temat badawczy to próba skorelowania fizycznego opisu oddziaływania promieniowania, w tym reakcji chemicznych w środowisku komórkowym, z biologicznymi punktami

końcowymi (przeżycie komórki, indukcja ognisk naprawczych). Doktorantka Monika Mietelska bada wielkości nanondozymetryczne w kontekście zastosowania ich do interpretacji danych radiobiologicznych. W swojej pracy wykorzystuje parametry rozkładów prawdopodobieństwa indukcji klastrów jonizacyjnych o rozmiarze równym lub większym od ustalonej liczby jako potencjalne wielkości opisujące kompleksowość uszkodzeń biologicznych.

Wykorzystując możliwości, jakie daje nam nasze laboratorium radiobiologiczne, rozpoczęliśmy również badania dotyczące odpowiedzi na pytanie, czy istnieje mechanizm adaptacji komórek na działanie promieniowania jonizującego. W tym celu doktorant Mateusz Filipek analizuje odpowiedź komórek nowotworowych gruczołu krokowego na gęsto jonizujące cząstki alfa (^{241}Am) w sytuacji, gdy komórki te są napromienione wcześniej z wykorzystaniem niskich dawek pochodzących ze źródła ^{90}Sr (emitera promieniowania beta o niskim LET). Oprócz krzywych przeżywalności Mateusz przeprowadzi analizę ognisk naprawczych z wykorzystaniem naszego mikroskopu fluorescencyjnego.

5.3 Egzosomy i ich rola w radioterapii

We współpracy z naukowcami Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM) rozpoczęliśmy badania dotyczące egzosomów w kontekście optymalizacji radioterapii pacjentów onkologicznych. W tych pracach oprócz dr Wioletty Olejarz i dr. Tomasza Lorenza z WUM uczestniczą dwie doktorantki z Zakładu Fizyki Biomedycznej. Jedną z nich jest Beata Pszczółkowska, która pod moją opieką prowadzi badania w ramach swojego projektu doktorskiego z wykorzystaniem komórek nowotworowych gruczołu krokowego (PC3 i DU145, różniących się promieniowrażliwością). Jej temat badawczy dotyczy uwrażliwiania komórek nowotworowych na działanie promieniowania X i alfa przez dodanie do pożywki egzosomów, które są odpowiedzialne za komunikację międzykomórkową. Skuteczność działania egzosomów będzie analizowana z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej do obserwacji indukowanych ognisk naprawczych.

5.4 Zastosowanie druku 3D w radioterapii pacjentek z nowotworem piersi

W ramach współpracy z Narodowym Centrum Onkologii w Warszawie realizowany jest również projekt doktorski Edyty Dąbrowskiej-Szewczyk, pod opieką prof. Pawła Kukołowicza i moją. Badania Edyty dotyczą testowania nowych materiałów wykorzystywanych w druku 3D do tworzenia bolusów do napromieniania pacjentek z nowotworem piersi. Bolus służy do podwyższenia dawki powierzchniowej dostarczanej podczas klasycznej radioterapii fotonowej. Technologia druku 3D umożliwia przygotowanie bolusa indywidualnie dla każdego pacjenta, ale wymaga charakterystyki materiału wykorzystanego jako filament oraz struktury druku, który zawiera przestrzenie powietrzne. Dlatego dla prawidłowych obliczeń systemu planowania leczenia oraz prawidłowej rekonstrukcji obrazów tomografii komputerowej pomiary dozymetryczne dla bolusów wykrukowanych techniką 3D są niezbędne.

6 Osiągnięcia dydaktyczne, organizacyjne oraz popularyzujące naukę

6.1 Osiągnięcia dydaktyczne

6.1.1 Opieka nad studentami

Kiedy zostałam zatrudniona na Wydziale Fizyki UW moim zadaniem była opieka nad specjalnością FM, która była jedną z pięciu specjalności dostępnych w ramach studiów I i II stopnia na kierunku Zastosowania Fizyki w Biologii i Medycynie (ZFBM). Od września 2011 roku byłam promotorem (lub współpromotorem) 20 prac licencjackich (w tym II nagroda Polskiego Towarzystwa Nukleonicznego dla Marii Szoty) oraz 28 prac magisterskich (w tym wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Nukleonicznego dla Kingi Żelechowskiej-Matysiak). W bieżącym roku akademickim (2022/23) jestem promotorem 1 pracy licencjackiej oraz 4 prac magisterskich. Ze względu na interdyscyplinarność kierunku podejmuję się również opieki nad studentami z Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych. Obecnie jestem tutorem studentki, która oprócz fizyki wybrała chemię (przy czym po

rocznej współpracy zdecydowała, że zamieni profil chemiczny na profil fizyczny jako kierunek główny) oraz studenta, którego dodatkową dziedziną jest matematyka i informatyka.

W odpowiedzi na duże zaangażowanie i aktywność studentów FM w 2012 podjęłam się opieki nad Kołem Naukowym Fizyki Medycznej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego i pełniłam tę funkcję do 2019 roku. W tym roku opiekę nad Kołem przejął zatrudniony na Wydziale Fizyki UW dr Józef Ginter, a ja zostałam opiekunem nowo powstałego Koła Doktorantów Dawka LETalna. Dzięki świetnej pracy studentów udało nam się zorganizować kilka edycji konferencji oraz wydarzeń popularnonaukowych, o których piszę w Załączniku nr 3.

W okresie 11 lat mojej pracy na Wydziale byłam/jestem promotorem pomocniczym 7 doktorantów. Obecnie jeden doktorant obronił doktorat, troje spisuje wyniki swoich badań w formie rozprawy doktorskiej, a troje jest na etapie zbierania danych i ich analizy.

6.1.2 Organizacja nowych zajęć

Zajęcia przeze mnie prowadzone w większości dotyczą przedmiotów specjalistycznych na kierunku ZFBM dla studentów wybierających specjalność FM. W latach 2011-2014 brałam aktywny udział w pracach przy programie studiów I i II stopnia na kierunku ZFBM oraz koordynowaniu praktyk zawodowych. Szczególnym osiągnięciem było uruchomienie ćwiczeń z Planowania radioterapii; jesteśmy jedyną uczelnią, która w programie studiów FM, uczy studentów planowania leczenia z użyciem systemu do planowania leczenia — w 2013 roku uzyskaliśmy licencję programu PlanUNC (<http://planunc.radonc.unc.edu>).

6.1.3 Wyróżnienia i nagrody za działalność dydaktyczną

Moje zaangażowanie w działalność dydaktyczną zostało docenione zarówno przez władze Uniwersytetu Warszawskiego, jak i studentów. W 2013 roku otrzymałam Nagrodę Indywidualną II stopnia Rektora UW za osiągnięcia dydaktyczno-organizacyjne wspomagające rozwój specjalności Fizyka Medyczna oraz Nagrodę Indywidualną III stopnia Rektora Uniwersytetu Warszawskiego w 2017 roku. Na podstawie ankiet wypełnionych przez studentów zostało przyznane mi przez Dziekana Wydziału Fizyki UW wyróżnienie za prowadzenie ćwiczeń z *Wnioskowania statystycznego* (rok akademicki 2016/17) oraz za prowadzenie ćwiczeń z *Fizycznych podstaw radioterapii* w roku akademickim 2017/18.

6.1.4 Zajęcia prowadzone dla studentów zagranicznych

Podczas stażu podoktorskiego w Uniwersytecie w Sztokholmie w kwietniu 2016 roku poprowadziłam zajęcia laboratoryjne dot. dozymetrii promieniowania jonizującego w ramach kursu CELOD (Cellular effects of ionising radiation – introduction to radiation biology) organizowanego dla studentów biologii w Departmencie Biologii Molekularnej (The Wenner-Gren Institute).

Po powrocie do Polski zostałam poproszona o wygłoszenie wykładu dot. modelowania metodami MC uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem jonizującym dla studentów studiów II stopnia, którzy wybrali specjalność radiobiologia na Uniwersytecie w Sztokholmie. Od 2018 roku corocznie jestem zapraszana do Sztokholmu (oprócz okresu pandemii) i mam przyjemność wygłaszania wykładu pt. *The dose concept and Monte Carlo methods in radiation biology*.

6.2 Osiągnięcia organizacyjne

6.2.1 Laboratorium radiobiologiczne na Wydziale Fizyki UW

Kody MC oraz jednostka obliczeniowa są wystarczające do realizowania projektów dotyczących modelowania uszkodzeń DNA w komórkach poddanych działaniu promieniowania jonizującego. Żeby zwalidować doświadczalnie wyniki symulacji, niezbędne jest przeprowadzenie eksperymentów radiobiologicznych. Dzięki dofinansowaniu w ramach projektów FID w 2018 roku (około 197000 zł) i 2021 roku (około 177000 zł), których byłam kierownikiem, powstało laboratorium radiobiologiczne na Wydziale Fizyki UW. Prowadzenie badań radiobiologicznych w naszej grupie jest możliwe dzięki sprzętom,

w które wyposażone jest laboratorium; są to m.in. inkubatory i komora laminarna do hodowli i pracy z materiałem komórkowym, zamrażarka i naczynie Dewara, które umożliwia nam przechowywanie komórek w trakcie eksperymentów oraz tworzenie bazy komórkowej po ich zakończeniu. Obecnie mamy możliwość pracy z pięcioma liniami komórkowymi: dwie linie komórek nowotworowych oraz jedna linia komórek prawidłowych gruczołu krokowego; komórki kostniakomięsa oraz linia niedrobnokomórkowego nowotworu płuc. Laboratorium wyposażone jest również w dwa mikroskopy: optyczny, który został zakupiony w ramach jednego z projektów FID i jest wykorzystywany do codziennej pracy z materiałem komórkowym oraz fluorescencyjny, umożliwiający obrazowanie komórek w czasie rzeczywistym.

Dodatkowo wyposażyliśmy naszą pracownię izotopową klasy Z w źródła punktowe promieniowania beta oraz niezbędne detektory do przeprowadzenia weryfikacji dozymetrycznej. Zarówno laboratorium radiobiologiczne, jak i dostępne źródła umożliwiają nam realizowanie projektów z naukowcami z innych jednostek, takich jak Warszawski Uniwersytet Medyczny, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN oraz z firmami farmaceutycznymi.

W 2021 roku w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów UW powstała druga pracownia radiobiologiczna, która rozszerza zakres badań, które prowadzimy. Moja niewielka rola w tym przedsięwzięciu ograniczała się do udziału w granicie, którego środki umożliwiły zakup inkubatora do tamtejszej pracowni.

6.2.2 Innowacyjność

Wykorzystując moje doświadczenia, które zebrałam podczas pracy nad programem studiów dla FM, wzięłam udział w tworzeniu nowego kierunku studiów II stopnia Radiogenomika na Wydziale Chemii UW. Do moich obowiązków należy również wsparcie w opiece nad studentami w formie prowadzenia zajęć, prac magisterskich oraz projektów studenckich.

W swojej pracy staram się umożliwiać studentom uczestniczenie w badaniach, które prowadzimy w grupie, poprzez realizację ćwiczeń w ramach Pracowni fizycznej II stopnia oraz Pracowni specjalistycznej. Dlatego stworzyłam zestaw ćwiczeń, które studenci mogą wykonać w naszym laboratorium radiobiologicznym. Laboratorium powstało i zostało wyposażone w niezbędne sprzęty przy wsparciu finansowym Funduszu Innowacji Dydaktycznych (FID, projekt z 2018 oraz 2021 roku).

6.2.3 Współpraca krajowa i zagraniczna

Oprócz projektów doktorskich z dziedziny fizyki medycznej, które są realizowane na Wydziale Fizyki UW, udało nam się nawiązać współpracę i aktywnie działać naukowo z następującymi instytutami naukowymi:

- Narodowy Instytut Onkologii w Warszawie: badanie zależności pomiędzy prawdopodobieństwem zachorowania na nowotwory piersi i jajnika a mutacjami genu BRCA1 i BRCA2 (we współpracy z dr. Krzysztofem Fornalskim z Wydziału Fizyki Politechniki Warszawskiej);
- Centrum Cyklotronowe Bronowice: analiza porównawcza planów leczenia pacjentów z nowotworem płuc z wykorzystaniem radioterapii fotonowej i protonowej;
- Department of Molecular Biosciences, The Wenner-Gren Institute, Stockholm University, Szwecja: (i) badania uszkodzeń DNA w obszarze eu- i heterochromatyny komórek nowotworowych poddanych działaniu wiązek mieszanych promieniowania gamma i alfa, (ii) charakterystyka dozymetru krzemowego w zastosowaniach radiobiologicznych;
- Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, Monachium, Niemcy: analiza obrazów danych radiobiologicznych (ogniska naprawcze, aberracje chromosomowe);
- Danish Center for Particle Therapy, Uniwersytet Kliniczny w Aarhus, Dania: badania odpowiedzi komórek nowotworowych poddanych działaniu wiązek mieszanych protonów i fotonów;

- Loma Linda University, USA: symulacje komputerowe stężenia reaktywnych form tlenu powstałych w wyniku działania promieniowania elektronowego o wysokiej mocy dawki.

Te współprace umożliwiają nam prowadzenie badań na wysokim poziomie i podążanie za trendami światowymi.

6.3 Działalność popularyzatorska

Promocja badań była dla mnie ważnym zadaniem, żeby dotrzeć do zdolnych uczniów, którzy w przyszłości chcieliby kontynuować badania naukowe w ramach projektu doktorskiego i w ten sposób stworzyć młodą kadrę w zakresie FM na Wydziale Fizyki UW. Prowadzone przez mnie zajęcia i wykłady poświęcone zagadnieniom fizyki medycznej i nie tylko dedykowane są różnym grupom:

- licealiści:
 - wykłady wygłaszane w liceach na terenie województwa mazowieckiego (*Jak wygrać w chowanego z komórkami nowotworowymi* o obrazowaniu medycznym oraz *Jak badamy uszkodzenie i naprawę DNA, czyli czym zajmuje się radiobiologia*); kilka wykładów rocznie od 2017;
 - Letnia Szkoła Fizyki organizowana na Wydziale Fizyki UW: prowadzenie warsztatów *Czy komórki nowotworowe przeżywają radioterapię?* o wpływie oddziaływania promieniowania jonizującego na komórki ludzkie, corocznie z przerwami od 2012;
 - opieka indywidualna: projekt Kacpra Waluka i Jakuba Pietrzaka z XVIII LO im. Jana Zamoyskiego w Warszawie pt. *Weryfikacja dozymetryczna planu leczenia pacjenta onkologicznego z użyciem fantomu antropomorficznego wydrukowanego techniką 3D*; praca ta została zakwalifikowana do finału konkursu EUCYS i półfinału konkursu E(x)plory w roku 2019/20;
- uczniowie szkół podstawowych:
 - Fizyczna karuzela: prowadzenie warsztatów o magnetyzmie *Czym się różni magneZ od magneSu?* dla uczniów szkół podstawowych, kilka warsztatów w 2022 roku;
 - Letnia Szkoła Fizyki organizowana na Wydziale Fizyki UW: prowadzenie warsztatów *Czy komórki nowotworowe przeżywają radioterapię?* (zmieniony poziom zaawansowania w stosunku do zajęć dla licealistów), corocznie od 2021;
- współtworzenie strony Zakładu Fizyki Biomedycznej (brain.fuw.edu.pl), gdzie dzielimy się materiałami dydaktycznymi oraz wynikami badań;
- stworzenie filmów promocyjnych dla specjalności FM (wersja krótka: <https://youtu.be/tUScaXw1z0>, wersja długa: <https://youtu.be/C7j4xrZ-f2c>).

.....
(podpis wnioskodawcy)