AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej

Dr hab. inż. Joanna Chwiej, prof. AGH
Katedra Fizyki Medycznej i Biofizyki

Kraków, dn. 05 lipca 2019

Opinia o pracy doktorskiej p.t. „Zastosowanie metod cytogenetyki i algorytmów do kalkulacji dawki w przewidywaniu efektywności radioterapii" Pani mgr Kamili Rawojć

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Kamili Rawojć została przygotowana pod kierunkiem promotora – Pani dr hab. n. med. Anny Sowy-Staszczak oraz promotora pomocniczego – Pani dr Justyny Miszczyk. Zgodnie z odpowiednimi przepisami, została ona przygotowana w postaci cyklu powiązanych ze sobą tematycznie artykułów, które poprzedzone są krótkim autoreferatem obejmującym: listę publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, listy pozostałych publikacji stanowiących dorobek naukowy oraz doniesień konferencyjnych, streszczenie artykułów wchodzących w skład rozprawy oraz same artykuły, spis literatury pomocniczej oraz oświadczenia współautorów.

Zacznę od kwestii formalnych związanych z recenzowaną pracą. Wszystkie trzy publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej Mgr Kamili Rawojć opublikowane zostały w czasopismach z listy JCR o średnim współczynniku przebicia, a mianowicie: Nukleonika (IF: 0.585), International Journal of Radiation Biology (IF: 2.266) oraz Acta Physica Polonica A (IF: 0.857). Doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem w dwóch pierwszych pracach cyklu, w trzeciej jest drugim autorem. Współautorem jednej pracy jest Promotor rozprawy, a dwóch – Promotor pomocniczy. Wszystkie trzy prace są pracami wieloautorskimi. Dołączono do nich oświadczenia wszystkich współautorów, według których samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część każdej z nich stanowi indywidualny wkład Mgr Kamili Rawojć w opracowanie koncepcji badań, wykonanie eksperymentów oraz opracowanie i interpretację wyników badań. Jednocześnie wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na przedłożenie artykułów jako części Jej rozprawy doktorskiej.

Celem prowadzonych w ramach doktoratu Pani mgr Rawojć badań była ocena użyteczności wybranych metod cytogenetyki i algorytmów matematycznych obliczania dawki dla potrzeb lepszego przewidywania skuteczności radioterapii u konkretnego pacjenta, co wpłynąć może znacząco na optymalizację i indywidualizację procesu terapeutycznego. Badania Doktorantka prowadziła na limfocytach krwi obwodowej człowieka, *ex vivo*, a dobór takiego właśnie modelu komórkowego bardzo dobrze uzasadniła w autoreferacie. Spośród dostępnych metod cytogenetycznych wybrała dwie – test mikrojądrowy oraz test przedwczesnej kondensacji chromatyny, obie uznane międzynarodowo jako skuteczne metody oceny skutków działania promieniowania jonizującego na komórki oraz dawki pochłoniętej w biologicznej dozymetrii retrospektywnej. Pierwsza metoda, skuteczna dla dawek niższych niż 4 Gy, polega na ocenie liczby mikrojąder w komórkach dwujądrzastych powstających na skutek działania blokującej podział cytoplazmy, cytochalazyny B. Druga, polega na zliczaniu aberracji chromosomowych – fragmentów acentrycznych, chromosomów pierścieniowych w komórkach, przy uwzględnieniu fazy cyklu, w jakiej się znajdują. Użyteczność obu metod cytogenetycznych weryfikowano zarówno dla potrzeb dozymetrii biologicznej promieniowania fotonowego, jak i protonowego.

W pierwszej pracy wchodzącej w skład doktoratu Pani Kamili Rawojć, podjęto próbę oceny wpływu liczby zliczanych komórek dwujądrzastych na skuteczność testu mikrojądrowego w szacowaniu dawek od 60 MeV promieniowania protonowego oraz 250 keV promieniowania X dla zakresu dawek od 0,3 do 4 Gy. Uzyskane zależności częstości występowania mikrojąder w komórkach dwujądrzastych pozwoliły wyznaczyć krzywe dawka-skutek dla obu rodzajów promieniowania. W przypadku promieniowania fotonowego punkty eksperymentalne dopasowano wielomianem drugiego stopnia i nie zaobserwowano wpływu liczby analizowanych komórek na kształt dopasowanej krzywej. Dla protonów lepszy okazał się wielomian trzeciego stopnia, a kształt krzywej dawka-skutek wykazywał zależność od liczby badanych komórek dwujądrzastych. Mimo, iż ww. praca przeszła pozytywnie proces ewaluacji w czasopiśmie, pozwolę sobie jako recenzent zwrócić uwagę na pewne mankamenty i nieścisłości, jakie pojawiają się w publikacji, a mogą wpływać na wnioski zamieszczone zarówno w samej publikacji, jak i autoreferacie.

Uwaga 1:

Na rysunkach 1 i 2 zamieszczono zależności częstości występowania mikrojąder w funkcji dawki zaabsorbowanej uzyskane jako wartości średnie z pomiarów przeprowadzonych przez 3-ch badaczy, a jako niepewność częstości zastosowano odchylenie standardowe średniej. W przypadku trzech pomiarów średnia nie jest dobrą miarą wartości oczekiwanej, a odchylenie standardowe dobrą miarą rozrzutu wyników. Jeśli nawet uzyskane wyniki podlegają rozkładowi normalnemu (a tego nie wiemy), to do wyznaczenia niepewności tak małej próby należałoby zastosować przynajmniej rozszerzenie o odpowiednio dobrany współczynnik wynikający z testu *t*-Studenta. To jest uwaga raczej techniczna bardziej kluczowe jest nazywanie niepewności na wykresie błędem pomiarowym. Z pracy wynika, że jest to raczej rozrzut wyników uzyskanych przez niezależnych badaczy.

Uwaga 2:

Zamieszczone w tabelach 1 i 2 tej pracy, ale również w dwóch kolejnych pracach z cyklu, wyniki pomiarów i niepewności wyznaczonych parametrów prezentowane są niezgodnie z ogólnie przyjętymi normami, ze zbyt dużą dokładnością.

Uwaga 3:

Aby porównać wyniki testu mikrojądrowego dla różnej liczby analizowanych komórek dwujądrzastych zastosowano w pracy współczynniki korelacji Pearsona. Bliska jedności wartość tego współczynnika oznacza wysoką korelację uzyskanych wyników, ale nie odpowiada na pytanie, czy liczba zliczanych mikrojąder zależy od liczby analizowanych komórek dwujądrzastych. Podpowiadając Doktorantce, proponuję określić matematycznie zależność częstości mikrojąder zliczanych dla 1000 i 500 komórek.

Uwaga 4:

Zaskakujący jest wynik zliczania mikrojąder uzyskany przez jedynego doświadczonego badacza dla dawki 3 Gy od promieniowania protonowego (rysunek 4). Skoro ten wynik tak bardzo odbiega od pozostałych i silnie modyfikuje ostateczny kształt krzywej dawka-skutek dla protonów (rysunek 2), to czy nie rozsądne byłoby jego zweryfikowanie przez dodatkowego niezależnego czwartego badacza?

Uwaga 5:

Czy moc dawki od promieniowania fotonowego i protonów może mieć wpływ na uzyskane wyniki, jeśli tak to jaki?

W drugiej publikacji z cyklu, w podobnym schemacie eksperymentalnym, oceniano wpływ liczby analizowanych komórek w fazie G2/M na zależności dawka-skutek otrzymane w oparciu o analizę nadmiarowych fragmentów chromosomów czyli metodę przedwczesnej kondensacji chromatyny. W tej pracy również dokonano porównania wyników otrzymanych dla promieniowania fotonowego i protonów, ale tym razem analizowano wpływ wysokich dawek – od 5 do 20 Gy. Bazując na teście Fishera wykazano podobieństwo zależności otrzymanych dla obu rodzajów promieniowania. Dopasowanie danych doświadczalnych wielomianem drugiego stopnia pozwoliło z dobrą dokładnością oszacować dawkę pochłoniętą dla nieznanych próbek. Co ciekawe zgodność uzyskanych wyników z rzeczywistą dawką była lepsza, gdy wzięto pod uwagę 75 a nie 150 komórek w fazie G2/M. I tu znów rolą moją jako recenzenta jest zwrócenie uwagi na pewne uchybienia, mimo iż druga publikacja z cyklu również pozytywnie przeszła proces recenzji.

Zmieszczone powyżej uwagi 1-3 tyczą się również drugiej publikacji.

Uwaga 6:

Doktorantka zamiennie stosuje nazwy: „przedwczesna kondensacja chromatyny" i „przedwczesna kondensacja chromosomów", która nazwa metody jest poprawna.

Uwaga 7:

Na czym dokładnie polegała normalizacja niepewności przeprowadzona wg wzoru (1). Czy przypadkiem nie jest to prawo przenoszenia niepewności? Jeśli tak, to czy na pewno uprawnione jest tu jego stosowanie?

Uwaga 8:

Zamieszczone na rysunku 3 dane są trudne do interpretacji. Na rysunku nie opisano osi wartości funkcji. Takiego opisu nie znalazłam również w tekście dotyczącym wykresu. Czy na osi pionowej znajduje się bezwzględna liczba nadmiarowych fragmentów chromosomów zliczonych dla 150 lub 75 komórek w fazie G2/M? Na rysunku identycznym symbolem oznaczono dane uzyskane dla protonów przy zliczaniu prowadzonym dla 75 i 150 komórek, co dodatkowo utrudnia interpretację rysunku.

Uwaga 9:

Nie do końca wiadomo jak interpretować, przedstawione w tabelach 1 i 2, współczynniki A, B i C. Nie podano w artykule postaci dopasowywanej funkcji, czy jest taka sama jak w pierwszym artykule z cyklu?

Uwaga 10:

Zarówno liczba nadmiarowych fragmentów chromosomów, jak i jej niepewność powinny być zaokrąglone co najmniej do jedności (w zależności od wartości niepewności). Liczba nadmiarowych fragmentów chromosomów jest bowiem liczbą całkowitą, a ułamek wynika jedynie z uśredniania wyników uzyskanych przez kilku badaczy.

Uwaga 11:

Nie jest dla mnie jasne jak uzyskano krzywe zaprezentowane na rysunkach 4a i 4b. Jaki model tu zastosowano? Czy był on właściwy, skoro na pierwszy rzut oka widać, że jakość dopasowania w wielu przypadkach jest bardzo słaba?

W trzeciej, ostatniej, publikacji porównano użyteczność dwóch algorytmów obliczania dawki w systemie planowania leczenia, a mianowicie standardowo stosowanego szybkiego algorytmu PBC (pencil beam convolution) oraz jego rozszerzenia algorytmu AAA (analytical anisotropic algoritm). Należy zaznaczyć, że wykorzystujący symulacje Monte Carlo algorytm AAA stanowi rozszerzenie na 3 wymiary algorytmu PBC. Dlatego też nie dziwi uzyskana dla niego lepsza zgodność dawki z wartością wyznaczoną eksperymentalnie. W mojej opinii jest to najsłabsza publikacja z cyklu, której wyniki były dość łatwe do przewidzenia z góry. W publikacji pojawiają się uchybienia podobne do tych, które opisałam wcześniej, brak również krytycznej dyskusji wyników w kontekście aktualnej literatury.

Podsumowanie:

Niezależnie od przedstawionych powyżej uwag krytycznych, przedstawione w ramach pracy wyniki wskazują na dużą wiedzę Doktorantki w zakresie realizowanego tematu, a także predyspozycje do pracy w interdyscyplinarnym zespole i dobre przygotowanie w zakresie stosowanych metod eksperymentalnych. Należy podkreślić, dodatkowo, że stanowiące doktorat artykuły stanowią jedynie niewielką część dorobku Pani Rawojć, która jest osobą bardzo aktywną naukowo, co potwierdza Jej uczestnictwo w licznych konferencjach krajowych i zagranicznych. Co więcej, uzyskane w ramach doktoratu rezultaty, zwłaszcza optymalizacja protokołów testu mikrojądrowego oraz testu przedwczesnej kondensacji chromosomów, mające na celu maksymalne skrócenie czasu trwania badań, mogą wnieść wkład w rozwój dozymetrii biologicznej prowadzonej z ich użyciem, a tym samych dyscypliny naukowej, jaką reprezentuje Pani mgr Rawojć. Dlatego, stwierdzam, że rozprawa spełnia zwyczajowe i formalne warunki stawiane rozprawom doktorskim w *ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach naukowych w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku z*

późniejszymi zmianami. Tym samym wnioskuję do Rady Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum UJ o dopuszczenie Pani mgr Kamili Rawojć do publicznej obrony pracy doktorskiej oraz dalszych etapów przewodu doktorskiego.