

Kielce 15 maja 2018 roku

Dr Halina Lisowska
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
Wydział Matematyczno-Przyrodniczy
Instytut Biologii
Zakład Radiobiologii i Immunologii
Ul. Świętokrzyska 15
25-406 Kielce

Centralna Komisja
Do Spraw Stopni i Tytułów
Pl. Defilad 1, 00-901

Autoreferat

1. **Imię i Nazwisko:** Halina Lisowska
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**
 - magister biologii
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, 1992
 - doktor nauk biologicznych
Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Warszawie, 2008
Tytuł rozprawy: *Badania nad osobniczą promieniowrażliwością pacjentów poddawanych radioterapii oraz dawców zdrowych.*
3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**
 - 2001-2008 – pracownik techniczno-naukowy w Zakładzie Radiobiologii i Immunologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach
 - od 2008 – adiunkt w Zakładzie Radiobiologii i Immunologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach
4. **Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**
 - a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:
Wpływ hipotermii na odpowiedź komórkową wywołaną promieniowaniem jonizującym.
 - b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

- 1) Dang L, Lisowska H, Manesh SS, Sollazzo A, Deperas-Kaminska M, Staff E, Haghdoost S, Brehwens K, Wójcik A.
Radioprotective effect of hypothermia on cells – a multiparametric approach to delineate the mechanisms.
International Journal of Radiation Biology, 7:507-14, 2012
- 2) Lisowska H, Wegierek-Ciuk A, Banasik-Nowak A, Braziewicz J, Wojewodzka M, Wójcik A, Lankoff A.
The dose-response relationship for dicentric chromosomes and γ -H2AX foci in human peripheral blood lymphocytes: influence of temperature during exposure and intra- and inter-individual variability of donors.
International Journal of Radiation Biology, 89:191-199, 2013
- 3) Lisowska H, Brehwens K, Zölzer F, Węgierek-Ciuk A, Czub J, Lankoff A, Haghdoost S, Wójcik A.
Effect of hypothermia on radiation-induced micronuclei and delay of cell cycle progression in TK6 cells.
International Journal of Radiation Biology, 90:318-24, 2014
- 4) Cheng L, Lisowska H, Sollazzo A, Węgierek-Ciuk A, Stępień K, Kuszewski T, Lankoff A, Haghdoost S, Wójcik A.
Modulation of radiation-induced cytogenetic damage in human peripheral blood lymphocytes by hypothermia.
Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 793:96-100, 2015
- 5) Lisowska H, Cheng L, Sollazzo A, Lundholm L, Węgierek-Ciuk A, Sommer S, Lankoff A, Wójcik A.
Hypothermia modulates the DNA damage response to ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes.
International Journal of Radiation Biology,
<https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1466206>, 2018
- c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Inkubacja żywych komórek w temperaturze topniejącego lodu (ok. 0-1°C) jest jedną z rutynowych metod laboratoryjnych stosowanych we współczesnej biologii. Szczególnie

często stosowana jest ona w badaniach radiobiologicznych, gdy jej celem jest zahamowanie lub obniżenie naprawy DNA, syntezy białek lub innych komórkowych procesów podczas transportowania materiału badawczego lub przygotowania go do analiz. W eksperymentach radiobiologicznych komórki napromienia się w temperaturze fizjologicznej (37°C), w temperaturze topniejącego lodu (ok. 0-1°C) lub w temperaturze pokojowej. Chociaż od dawna wiadomo, że temperatura podczas napromienienia wpływa na odpowiedź komórkową, mechanizmy tego zjawiska i efekty biologiczne na poziomie molekularnym i komórkowym nie są w pełni jasne. Przykładowo, w latach 1930-tych i 1940-tych, Sax i Enzmann stwierdzili, że wysoka temperatura podczas lub po napromienieniu prowadzi do większych „szkód” niż napromienianie w niskiej temperaturze. Natomiast wyniki badań na mikrosporach *Tradescantia* wykazały, że niska temperatura podczas napromieniania prowadzi do podwyższonej częstości uszkodzeń chromosomowych (Sax i Enzmann 1939, Sax 1947). Większość badań z ostatnich lat donosi o ochronnym działaniu niskiej temperatury (hipotermii) na poziom popromiennych uszkodzeń DNA, który w dalszej części będzie nazywany efektem temperaturowym. Ochronny efekt hipotermii zaobserwowano podczas analizy danych testu przeżywalności (Belli and Bonte 1963, Elmroth i wsp. 2000, Mason i wsp. 2011), przeżywalności myszy (Levan i wsp. 1970), aktywności enzymów (Kempner i Haigler 1982), częstości aberracji chromosomowych (Bajerska i Liniecki 1969, Gumrich i wsp. 1986), częstości mikrojąder (Brzozowska i wsp. 2009, Brehwens i wsp. 2010) i rozwijania superspirali DNA (Elmroth i wsp. 1999). Jednak efekt temperaturowy nie zawsze jest widoczny dla różnych punktów końcowych w tych samych komórkach. W badaniach dotyczących linii komórek nowotworowych piersi MCF-7 efekt temperaturowy zaobserwowano na poziomie rozwijania superspirali DNA (Elmroth i wsp. 1999), ale nie stwierdzono go na poziomie indukcji mikrojąder (Larsson i wsp. 2007). Natomiast w przypadku ludzkich limfocytów krwi obwodowej efekt temperaturowy stwierdzono na poziomie indukcji mikrojąder, ale nie zaobserwowano go na poziomie uszkodzeń początkowych mierzonych testem kometowym (Brzozowska i wsp. 2009).

Poznanie mechanizmów działania niskiej temperatury na uszkodzenia popromienne jest interesujące i ważne zarówno z perspektywy zrozumienia komórkowej odpowiedzi na promieniowanie jonizujące jak również ze względu na fakt, że czynnik temperaturowy może mieć wpływ na interpretację wyników eksperymentalnych. Szczególnie istotną jest znajomość efektu temperaturowego w interpretacji wyników dozymetrii biologicznej, której celem jest prawidłowe oszacowanie dawki pochłoniętej przez osoby przypadkowo narażone na promieniowanie jonizujące.

Obecnie znanych jest kilka metod dozymetrii biologicznej, które różnią się specyficznością i czułością na promieniowanie jonizujące oraz czasem uzyskania wyników. Wśród nich, do najbardziej czułych i wiarygodnych metod zalicza się test chromosomów dicentrycznych, test mikrojądrowy oraz test gamma-H2AX. Test chromosomów dicentrycznych jest obecnie „złotym standardem” dozymetrii biologicznej i polega na ocenie częstości chromosomów dicentrycznych w limfocytach krwi obwodowej osób narażonych na promieniowanie jonizujące. Jest on standaryzowany na poziomie międzynarodowym (ISO 19238). Test mikrojądrowy polega na liczeniu częstości mikrojąder w cytoplazmie interfazowych komórek, powstałych po pierwszym podziale komórkowym. Metodyka testu mikrojądrowego została również standaryzowana na poziomie międzynarodowym (ISO 21243). Natomiast test gamma-H2AX jest jednym z najbardziej obiecujących testów dozymetrii biologicznej i polega na immunofluorescencyjnej analizie częstości ognisk ufosforylowanego histonu gamma-H2AX. Zarówno częstość chromosomów dicentrycznych, mikrojąder, jak i ognisk histonu gamma-H2AX w limfocytach krwi obwodowej osób potencjalnie narażonych na promieniowanie jonizujące jest porównywana do krzywych kalibracyjnych, przygotowanych przez napromienianie limfocytów krwi obwodowej w warunkach *in vitro*. Biorąc pod uwagę fakt, że czynnik temperaturowy może wpływać na poziom uszkodzeń DNA (Gumrich i wsp. 1986, Brzozowska i wsp. 2009, Brehwens i wsp. 2010) ważnym jest, aby krzywe kalibracyjne dla celów dozymetrii biologicznej były przygotowywane na podstawie eksperymentów przeprowadzanych w ściśle określonych warunkach temperaturowych.

W związku z tym, w mojej pracy naukowej skupiłam się głównie na badaniach mających na celu wyjaśnienie mechanizmów efektu temperaturowego. Wynikiem tej pracy jest cykl 5 publikacji naukowych, stanowiący podstawę do oceny. Skróconą charakterystykę poszczególnych prac przedstawiono w dalszej części rozprawy.

We wszystkich przeprowadzonych eksperymentach w opisanych badaniach próbki inkubowano w temperaturze topniejącego lodu, która wynosiła 0,8°C, ale dla uproszczenia oznaczono jako 0°C.

Punktem wyjścia dla pierwszych eksperymentów były wyniki badań, które sugerowały, że promieniochronne działanie hipotermii może być związane z pośrednim działaniem promieniowania jonizującego, gdzie czynnikiem uszkadzającym DNA są wolne rodniki. W badaniach tych zaobserwowano bardziej wymowny efekt temperaturowy po ekspozycji komórek na promieniowanie o niskim LET (Liniowe Przekazywanie Energii, ang. Linear Energy Transfer) niż o wysokim LET (Brzozowska i wsp. 2009). Dodatkowo, w komórkach traktowanych dimetylosulfotlenkiem (DMSO), który jest „zmiataczem” wolnych rodników nie

obserwowano efektu temperaturowego (Brzozowska i wsp. 2009, Elmroth i wsp. 2000b). Natomiast wyniki badań Elmroth i wsp. 2003, w których zaobserwowano bardziej wymowny efekt temperaturowy w nukleoidach niż w permeabilizowanych lub nienaruszonych ludzkich fibroblastach wskazały na możliwą rolę poziomu organizacji DNA, a tym samym dostępności dla wolnych rodników.

Celem pierwszej z prac składających się na moje osiągnięcie naukowe było zbadanie potencjalnych mechanizmów stojących za efektem temperaturowym przy użyciu kilku punktów końcowych. Eksperymenty przeprowadzono na ludzkich komórkach limfoblastycznych TK6.

1. Dang L, Lisowska H, Manesh SS, Sollazzo A, Deperas-Kaminska M, Staff E, Haghdoost S, Brehwens K, Wójcik A.

Radioprotective effect of hypothermia on cells – a multiparametric approach to delineate the mechanisms.

International Journal of Radiation Biology, 7:507-14 (2012)

W powyższej pracy zbadano rolę szlaku sygnałowego uruchamianego podczas uszkodzeń DNA przez zahamowanie kinazy ATM (ang. Ataxia Teleangiectasia Mutated) oraz rolę struktury chromatyny przez zastosowanie inhibitora deacetylazy histonowej. Popromienne uszkodzenia cytogenetyczne mierzono testem mikrojądrowym. Sprawdzono również, czy efekt temperaturowy jest widoczny na poziomie indukcji podwójnoniciowych pęknięć DNA oraz kinetyki ich naprawy za pomocą testu gamma-H2AX oraz na poziomie przeżywalności przy użyciu klonogenego testu przeżywalności.

Analiza wyników wykazała, że częstość mikrojąder w komórkach napromienionych w temperaturze 0°C była około o 50% niższa w porównaniu do częstości mikrojąder w komórkach napromienionych w temperaturze 37°C, co było potwierdzeniem wystąpienia efektu temperaturowego w komórkach TK6. Efektu tego nie zaobserwowano zarówno na poziomie podwójnoniciowych pęknięć DNA jak i kinetyki ich naprawy mierzonych testem gamma-H2AX. Podobnie, stwierdzono brak efektu temperaturowego na poziomie przeżywalności mierzonej klonogenym testem przeżywalności.

W celu zbadania, czy efekt temperaturowy jest związany z wykrywaniem i przetwarzaniem pierwotnych uszkodzeń DNA przez kinazę ATM, komórki TK6 traktowano jej inhibitorem – KU55933, a następnie napromieniano je uwzględniając różne temperatury napromienienia. Analiza częstości mikrojąder wykazała, że traktowanie komórek inhibitorem kinazy ATM nie

zniosło efektu temperaturowego sugerując, że nie jest on związany z zależnym od ATM przetwarzaniem uszkodzeń pierwotnych DNA.

Zbadano następnie wpływ konformacji chromatyny na efekt temperaturowy. W tym celu komórki TK6 traktowano trichostatyną A (TSA), będącą inhibitorem deacetylazy histonowej. Badania wykazały, że zahamowanie aktywności deacetylazy histonowej, a tym samym utrzymanie otwartej konformacji chromatyny, znosi efekt temperaturowy. Otrzymane wyniki sugerowały, że chromatyna utrzymywana w otwartej konformacji nie kondensuje w niskiej temperaturze i nie jest w stanie chronić DNA przed atakiem wolnych rodników. Jednak traktowanie komórek TSA spowodowało nie tylko podwyższenie poziomu mikrojąder w komórkach napromienianych w temperaturze 0°C, ale również obniżenie go w komórkach napromienianych w temperaturze 37°C. Zatem uzyskane wyniki nie udowodniły roli konformacji chromatyny w efekcie temperaturowym. Istnieją dane literaturowe wskazujące, że traktowanie komórek TK6 inhibitorem TSA nie tylko hamuje deacetylazę histonową, ale również powoduje zatrzymanie komórek w fazie G1 cyklu komórkowego (Olaharski i wsp. 2006). W badaniach własnych blok G1 po zastosowaniu TSA zaobserwowano na poziomie indeksu replikacji (IR). Pojawiło się przypuszczenie, że TSA opóźnia przejście komórek przez cykl komórkowy zarówno w próbkach napromienionych w temperaturze 0°C jak i 37°C oraz, że efekt temperaturowy może być związany z modulacją cyklu komórkowego. Aby wyjaśnić to zjawisko, zastosowano w teście mikrojądrowym protokół seryjnego utrwalania, w którym częstość mikrojąder analizowano w kilku odstępach czasowych po napromienieniu. Uzyskane wyniki pokazały, że efekt temperaturowy występuje w pierwszym odstępie czasowym po napromienieniu (27 godz.), po czym w kolejnych odstępach czasowych zanika, tym samym popierając sugestię, że niska temperatura może indukować tymczasowe opóźnienie cyklu komórkowego w komórkach napromienionych w temperaturze 0°C. To przypuszczenie tłumaczyłoby również uzyskane uprzednio wyniki, w których nie zaobserwowano efektu temperaturowego zarówno na poziomie powstawania i zanikania ognisk naprawczych gamma-H2AX jak i na poziomie przeżywalności mierzonej klonogennym testem przeżywalności.

Celem kolejnej pracy wchodzącej w skład mojego osiągnięcia naukowego było zbadanie wpływu hipotermii na częstość popromiennych aberracji chromosomowych oraz ognisk naprawczych gamma-H2AX w izolowanych ludzkich limfocytach krwi obwodowej. Limfocyty napromieniano w temperaturze 0°C, 20°C i 37°C. Dodatkowo zbadano wpływ temperatury na międzyosobniczą i wewnątrzosobniczą zmienność promieniowrażliwości dawców.

2. Lisowska H, Wegierek-Ciuk A, Banasik-Nowak A, Braziewicz J, Wojewodzka M, Wójcik A, Lankoff A.

The dose-response relationship for dicentric chromosomes and γ -H2AX foci in human peripheral blood lymphocytes: influence of temperature during exposure and intra- and inter-individual variability of donors.

International Journal of Radiation Biology, 89:191-199 (2013)

Analiza wyników wykazała, że średnia częstość chromosomów dicentrycznych wzrastała wraz ze wzrastającą dawką promieniowania, niezależnie od temperatury napromieniania. Średnia częstość chromosomów dicentrycznych w limfocytach napromienionych w temperaturze 0°C była znacząco niższa niż w limfocytach napromienionych w temperaturze 37°C odpowiadającymi dawkami. Wyniki te potwierdziły wcześniejsze doniesienia o istnieniu efektu temperaturowego w limfocytach krwi obwodowej (Bajerska i Liniecki 1969, Gumrich i wsp. 1986, Brzozowska i wsp. 2009).

W celu sprawdzenia, czy zaobserwowany efekt na poziomie chromosomów dicentrycznych jest również widoczny na poziomie powstawania i zanikania podwójnoniciowych pęknięć DNA, zastosowano test gamma-H2AX. Analizowano częstość ognisk naprawczych gamma-H2AX za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oraz intensywność fluorescencji ognisk gamma-H2AX za pomocą cytometrii przepływowej. Analiza wyników wykazała, że zarówno częstość ognisk naprawczych gamma-H2AX jak i intensywność ich fluorescencji wzrasta w komórkach liniowo wraz z dawką promieniowania. Pomimo, że nie zaobserwowano znamienego efektu temperaturowego na poziomie ognisk naprawczych dla zastosowanych dawek promieniowania, to intensywność względnej fluorescencji była wyższa w komórkach napromienianych w 0°C niż w 20°C i 37°C. Wyniki dotyczące kinetyki zanikania ognisk gamma-H2AX (kinetyki naprawy DNA) wykazały, że częstość ognisk naprawczych w napromienionych limfocytach osiąga maksimum po 30 minutach po napromienieniu, a następnie znacząco spada w czasie dalszej inkubacji. Jednak nie zaobserwowano efektu temperaturowego dla żadnego z zastosowanych punktów czasowych. Zatem uzyskane wyniki nie potwierdziły hipotezy, że hipotermia chroni DNA przed działaniem wolnych rodników, podobnie jak obserwowano w przypadku komórek TK6. Dodatkowo, wyniki cytometrii przepływowej pokazały wyższy poziom intensywności fluorescencji ognisk gamma-H2AX, a tym samym uszkodzeń DNA, dla temperatury napromieniania 0°C. Wynik ten, mimo, że nieistotny statystycznie, wydaje się logiczny ze względu na fakt, że enzymatyczne procesy, takie jak naprawa DNA, są zahamowane w temperaturze 0,8°C (Ward

i wsp. 1991). Dodatkowo, wyniki Markowa i wsp. (2007) wykazują, że inkubacja napromienionych komórek w temperaturze bliskiej 0°C hamuje powstawanie ognisk naprawczych gamma-H2AX. Stąd, podczas napromieniania komórek w temperaturze bliskiej 0°C i pomiarze uszkodzeń DNA w krótkim czasie po napromienieniu można oczekiwać większych uszkodzeń popromiennych niż w przypadku napromienienia komórek w temperaturze 37°C.

Kolejna seria eksperymentów miała na celu zbadanie, czy kolejność traktowania komórek niską temperaturą i promieniowaniem ma wpływ na efekt temperaturowy. Komórki TK6 traktowano hipotermią przed, w trakcie oraz po napromienieniu oraz analizowano częstość mikrojąder. Analizowano również kinetykę cyklu komórkowego za pomocą testu wzrostu oraz cytometrii przepływowej.

3. Lisowska H, Brehwens K, Zölzer F, Węgierek-Ciuk A, Czub J, Lankoff A, Haghdoost S, Wójcik A.

Effect of hypothermia on radiation-induced micronuclei and delay of cell cycle progression in TK6 cells.

International Journal of Radiation Biology, 90:318-24, (2014)

Powodem dla sprawdzania, czy kolejność traktowania komórek hipotermią oraz promieniowaniem odgrywa rolę w efekcie temperaturowym były wyniki Brzozowskiej i wsp. (2009) uzyskane w wyniku traktowania ludzkich limfocytów DMSO (dimetylsulfotlenkiem), zmiataczem wolnych rodników. Rezultaty te wskazały, że efekt temperaturowy może być związany z modulacją konformacji chromatyny, powodując ochronę DNA przed atakiem wolnych rodników. Falk i wsp. (2008) wykazali, że kondensacja chromatyny ma promienioochronny wpływ na DNA, a zatem można przypuszczać, że schłodzenie komórek może prowadzić do kondensacji chromatyny.

Zaobserwowano, że niezależnie od kolejności traktowania komórek hipotermią w stosunku do napromieniania, częstość mikrojąder była znacząco niższa w komórkach napromienianych w 0°C, w porównaniu do komórek napromienianych w temperaturze 37°C. Zatem efekt temperaturowy wystąpił nawet wtedy, gdy traktowanie hipotermią oraz napromienianie było rozdzielone czasowo. Uzyskane wyniki potwierdziły nasze wcześniejsze przypuszczenia, że nie jest on związany z obniżonym poziomem uszkodzeń DNA po napromienieniu w temperaturze 0°C. Wyniki te osłabiły również inną hipotezę przedstawioną przez Brzozowską i wsp. (2009), według której efekt temperaturowy mógł być związany z zahamowaniem efektu widza

i prowadzić do obniżonego poziomu uszkodzeń DNA. Wprawdzie można byłoby sobie wyobrazić, że efekt widza, który jest odpowiedzialny za 20-50% uszkodzeń DNA obserwowanych po napromienieniu (Ryan i wsp. 2008) jest zahamowany w komórkach schłodzonych do temperatury 0°C i napromienionych w tym samym czasie. Jednak mało prawdopodobne byłoby takie wytłumaczenie efektu temperaturowego, zaobserwowanego po sekwencyjnej ekspozycji komórek na hipotermię i promieniowanie.

Kolejne badania dotyczyły sprawdzenia hipotezy, że efekt temperaturowy może być związany z perturbacjami w cyklu komórkowym (Dang i wsp. 2012). W tym celu podjęto próbę zidentyfikowania zmian w progresji cyklu komórkowego pomiędzy komórkami napromienionymi w 37°C i 0°C. Analizowano kinetykę wzrostu komórek przez tydzień od napromienienia, rozkład komórek w cyklu komórkowym przez 24 godziny oraz względny ruch komórek w ciągu 6 godzin po napromienieniu. W żadnym z zastosowanych punktów końcowych nie zaobserwowano różnic w progresji cyklu komórkowego pomiędzy komórkami napromienionymi w tych dwóch temperaturach. Uzyskane wyniki wykazały, że efekt temperaturowy obserwowany w komórkach TK6 na poziomie mikrojąder albo nie jest związany z modyfikacją cyklu komórkowego, bądź te modyfikacje znajdują się poniżej zdolności rozdzielczej zastosowanych technik pomiarowych.

Jedynym wiarygodnym wyjaśnieniem obniżonej częstości mikrojąder w komórkach napromienionych w temperaturze 0°C wydawała się eliminacja uszkodzonych komórek z puli analizowanych komórek. Jeśli czynnikiem odpowiedzialnym za ten efekt nie było przejściowe zatrzymanie komórek w cyklu, to innym, prawdopodobnym czynnikiem mogła być śmierć uszkodzonych komórek. W celu sprawdzenia tej hipotezy poddano analizie zawartość DNA na cytometrycznych histogramach, które pozwoliły zidentyfikować szczątki komórkowe, charakteryzujące się zawartością DNA niższą niż komórki w fazie G1 cyklu komórkowego (frakcja sub-G1). Szczątki komórek uważane są za przejaw apoptotycznej i nekrotycznej śmierci komórkowej (Darzynkiewicz i wsp. 1997). Uzyskane wyniki wykazały brak różnic w poziomie i kinetyce indukcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych w odniesieniu do obu temperatur.

Eksperymenty z użyciem komórek pochodzących z linii komórkowej charakteryzującej się intensywnymi podziałami prowadzą do tego, że napromieniane są komórki znajdujące się w różnych fazach cyklu komórkowego. Biorąc pod uwagę fakt, że promieniowrażliwość komórek zmienia się w zależności od cyklu komórkowego (Savage i wsp. 1973), problematyczną staje się interpretacja wyników cytogenetycznych. Bardziej stabilnym systemem komórkowym są limfocyty krwi obwodowej, które są naturalnie zsynchronizowane

w fazie G₀ cyklu komórkowego (Obe i wsp. 1984). Co więcej, napromieniając świeżo pobraną krew, napromieniamy komórki, które są homogenne pod względem promieniowrażliwości. Wiadomym jest, że traktowanie komórek może wywołać opóźnienie cyklu komórkowego, które prowadzi do pełnej ekspresji uszkodzeń cytogenetycznych w późniejszym czasie zbierania komórek (Gudowska-Nowak i wsp. 2005). Stąd analiza uszkodzeń cytogenetycznych z pojedynczego czasu zbierania komórek może powodować problemy z interpretacją wyników. Możliwością przezwyciężenia tego problemu jest analiza uszkodzeń cytogenetycznych w limfocytach krwi obwodowej, zbieranych sekwencyjnie (Ritter i wsp. 2002, Johannes i wsp. 2010). Celem kolejnych badań było użycie limfocytów krwi obwodowej w celu zbadania, czy obniżona częstość mikrojąder po zastosowaniu standardowego czasu zbierania komórek (72 godziny po napromienieniu), będzie również widoczna po zastosowaniu wydłużonych czasów zbierania komórek (96 i 120 godzin po napromienieniu). Dodatkowo analizowano poziom popromiennej apoptozy w celu sprawdzenia, czy efekt temperaturowy może być spowodowany selektywną eliminacją uszkodzonych komórek. Badania przeprowadzono w dwóch niezależnych laboratoriach: na Uniwersytecie Jana Kochanowskiego w Kielcach oraz Uniwersytecie w Sztokholmie.

4. Cheng L, Lisowska H, Sollazzo A, Węgierek-Ciuk A, Stępień K, Kuszewski T, Lankoff A, Haghdoo S, Wójcik A.

Modulation of radiation-induced cytogenetic damage in human peripheral blood lymphocytes by hypothermia.

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 793:96-100 (2015)

Analiza wyników wykazała, że częstość mikrojąder w limfocytach napromienionych w temperaturze 0°C była znacząco niższa w porównaniu do limfocytów napromienionych w temperaturze 37°C. Różnice te zaobserwowano we wszystkich zastosowanych punktach czasowych zbierania komórek. Uzyskane wyniki potwierdziły, że efekt temperaturowy nie wynika z opóźnienia cyklu komórkowego komórek napromienionych w temperaturze 0°C. Dodatkowym potwierdzeniem jest również brak różnic w wartościach indeksu proliferacji oraz indeksu dyspersji pomiędzy komórkami napromienianymi w różnych temperaturach. Opóźnienie w cyklu komórkowym mogłoby prowadzić do obniżenia indeksu replikacji. Natomiast konsekwencją braku wysoce uszkodzonych komórek byłby obniżony indeks

dyspersji. Nie zaobserwowano także selektywnej śmierci komórek napromienianych w temperaturze 0°C.

Biorąc pod uwagę powyżej przedstawione wyniki pojawiło się przypuszczenie, że efekt temperaturowy może być związany z zależną od temperatury transformacją pierwotnych uszkodzeń DNA w uszkodzenia cytogenetyczne.

5. Lisowska H, Cheng L, Sollazzo A, Lundholm L, Węgierek-Ciuk A, Sommer S, Lankoff A, Wójcik A.

Hypothermia modulates the DNA damage response to ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes.

International Journal of Radiation Biology,

<https://doi.org/10.1080/09553002.2018.1466206>, 2018

Celem tej pracy była analiza kinetyki powstawania aberracji chromosomowych podczas pierwszych godzin po napromienieniu ludzkich limfocytów krwi obwodowej w temperaturach 0°C i 37°C. Zastosowano metodę przedwczesnej kondensacji chromatyny PCC (ang. Premature Chromosome Condensation). Dodatkowo, analizowano częstość aberracji chromosomowych w komórkach mitotycznych po 48 godzinach hodowli po napromienieniu. W celu wyjaśnienia molekularnych mechanizmów badanego zjawiska, analizowano zmiany ekspresji genów wrażliwych na promieniowanie jonizujące (BBC3, FDXR, GADD45A, XPC, MDM2 i CDKN1A) za pomocą metody qPCR oraz poziom ufosforylowania białek związanych z odpowiedzią komórki na popromienne uszkodzenia DNA: ATM, DNA-PK oraz p53 przy pomocy metody Western blot.

Analiza uzyskanych wyników wykazała znamienne niższą częstość fragmentów PCC w komórkach napromienionych w temperaturze 0°C w porównaniu do temperatury 37°C. Różnica ta jest widoczna już w pierwszym czasie obserwacji po napromienieniu (0,5 godziny) i nie zmienia się w kolejnych punktach obserwacji (2 i 4 godziny), aż do osiągnięcia pierwszego podziału mitotycznego (48 godzin). Wynik ten pokazał, że niezależnie od molekularnych mechanizmów efektu temperaturowego, zdarzenia, które prowadzą do obniżonej częstości aberracji po napromienieniu komórek w temperaturze 0°C następują w ciągu pierwszych 30 minut po ekspozycji.

W związku z uzyskanymi wynikami PCC pojawiło się pytanie, czy transformacja uszkodzeń DNA w chromosomowe pęknięcia po ekspozycji w temperaturze 0°C jest obniżona ponieważ naprawa DNA jest mniej wydajna, czy nie wszystkie podwójnoniciowe pęknięcia są

przekształcane w aberracje chromosomowe, co może być spowodowane obniżonym wykrywaniem uszkodzeń DNA. W celu analizy tego aspektu zmierzono poziom ufosforylowania białek: ATM (wykrywa uszkodzenia DNA), DNA-PK (kluczowe białko w niehomologicznej naprawie podwójnoniciowych pęknięć DNA) i p53 (białko zaangażowane w regulację genów naprawy uszkodzeń DNA i indukcję apoptozy (Jeggo 1997, Lane 1998, Szumiel 2008). Ponadto, zmierzono ekspresję sześciu genów, które jak wynika z danych literaturowych są wrażliwe na promieniowanie w ludzkich limfocytach krwi obwodowej i są uważane jako kandydaci dla celów dozymetrii biologicznej (Kabacik i wsp. 2011, Budworth i wsp. 2012, Brzoska i Kruszewski 2015, Ghandhi wsp. 2015).

Analiza wyników wykazała, że napromienianie komórek w temperaturze 0°C było związane z wyższym poziomem ufosforylowania białek ATM i DNA-PK w komórkach napromienionych temperaturze 0°C. Wynik ten sugeruje, że ekspozycja komórek na promieniowanie jonizujące w temperaturze 0°C jest związana z bardziej efektywnym rozpoznawaniem i naprawą uszkodzeń DNA. Proces ten powinien prowadzić do niższego poziomu śmierci komórkowej, co koreluje z zaobserwowanym, obniżonym poziomem aktywacji białka p53 w temperaturze 0°C, w porównaniu do temperatury 37°C. Z kolei obniżony poziom aktywacji białka p53 koreluje z obniżonym, ogólnym poziomem mRNA genów kontrolowanych przez białko p53, mierzonym po 4 godzinach po ekspozycji. Poziomy ekspresji mRNA analizowanych genów, mierzone po 24 godzinach po ekspozycji były niższe w komórkach napromienionych w temperaturze 37°C w porównaniu do temperatury 0°C co może być wyjaśnione oscylacyjną dynamiką p53 (Batchelor i wsp. 2009).

Podsumowując, wyniki potwierdzają ochronny wpływ niskiej temperatury na poziom uszkodzeń cytogenetycznych (chromosomów dicentrycznych i mikrojąder) zarówno w limfocytach krwi obwodowej jak i komórkach TK6. Nie zaobserwowano go jednak na poziomie powstawania podwójnoniciowych pęknięć DNA (ogniska gamma-H2AX) i kinetyki ich naprawy oraz testu przeżywalności. Wyniki wskazują również na wątpliwą rolę konformacji chromatyny oraz perturbacji cyklu komórkowego w efekcie temperaturowym. Stwierdzono również, że napromienianie komórek w niskiej temperaturze prowadzi do obniżonej transformacji uszkodzeń DNA w uszkodzenia chromosomowe. Chociaż uzyskane wyniki pozwoliły na wyjaśnienie istotnych zagadnień związanych z efektem temperaturowym, pełne wyjaśnienie mechanizmu tego fenomenu nadal pozostaje otwartą sprawą.

Na podstawie przedstawionego powyżej streszczenia 5 prac składających się na jednotematyczny cykl publikacji przedstawiony do oceny, za swoje główne osiągnięcia uważam wykazanie, że efekt temperaturowy:

- nie jest związany z selektywnym opóźnieniem komórek przechodzących przez cykl komórkowy,
- nie jest związany z selektywną eliminacją komórek apoptotycznych,
- nie jest ograniczony do równoczesnego traktowania komórek hipotermią i promieniowaniem,
- nie jest widoczny na poziomie pierwotnych uszkodzeń DNA,
- jest związany z wydajnością przekształcania pierwotnych uszkodzeń DNA na uszkodzenia cytogenetyczne.

Bibliografia

Bajerska A, Liniecki J. 1969a. The influence of temperature at irradiation in vitro on the yield of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine* 16:483 – 493.

Belli JA, Bonte FJ. 1963. Influence of temperature on the radiation response of mammalian cells in tissue culture. *Radiation Research* 18:272 – 276.

Brehwens K, Staaf E, Haghdoost S, Gonzalez AJ, Wojcik A. 2010. Cytogenetic damage in cells exposed to ionizing radiation under conditions of a changing dose rate. *Radiation Research* 173:283 – 289.

Brzoska K, Kruszewski M. 2015. Toward the development of transcriptional biodosimetry for the identification of irradiated individuals and assessment of absorbed radiation dose. *Radiation and Environmental Biophysics* 54: 353-363.

Brzozowska K, Johannes C, Obe G, Hentschel R, Morand J, Moss R, Wittig A, Sauerwein W, Liniecki J, Szumiel I, Wojcik A. 2009. Effect of temperature during irradiation on the level of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes exposed to X-rays and neutrons. *International Journal of Radiation Biology* 85:891 – 899.

Budworth H, Snijders AM, Marchetti F, Mannion B, Bhatnagar S, Kwoh E, Tan Y, Wang SX, Blakely WF, Coleman M i wsp. 2012. DNA repair and cell cycle biomarkers of radiation exposure and inflammation stress in human blood. *PLoS One*. 7:e48619.

Dang L, Lisowska H, Manesh SS, Sollazzo A, Deperas-Kaminska M, Staaf E, Haghdoost S, Brehwens K, Wojcik A. 2012. Radioprotective effect of hypothermia on cells – a multiparametric approach to delineate the mechanisms. *International Journal of Radiation Biology* 88: 507 – 514.

Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. 1997. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27: 1 – 20.

Elmroth K, Erkell LJ, Hultborn R. 1999. Influence of temperature on radiation-induced inhibition of DNA supercoiling. *Radiation Research* 152:137 – 143.

- Elmroth K, Nygren J, Erkell LJ, Hultborn R. 2000a. Effect of hypothermic irradiation of the growth characteristics of two human cell lines. *Anticancer Research* 20:3429 – 3433.
- Elmroth K, Nygren J, Erkell LJ, Hultborn R. 2000b. Radiation-induced double-strand breaks in mammalian DNA: Influence of temperature and DMSO. *International Journal of Radiation Biology* 76: 1501 – 1508.
- Elmroth K, Nygren J, Stenerlow B, Hultborn R. 2003. Chromatin- and temperature-dependent modulation of radiation-induced double-strand breaks. *International Journal of Radiation Biology* 79:809 – 816.
- Falk M, Lukasova E, Kozubek S. 2008. Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to gamma-radiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783: 2398 – 2414.
- Ghandhi SA, Smilenov LB, Elliston CD, Chowdhury M, Amundson SA. 2015. Radiation dose-rate effects on gene expression for human biodosimetry. *BMC Med Genomics*. 8:22–30.
- Gudowska-Nowak E, Kleczkowski A, Nasonova E, Scholz M, Ritter S. 2005. Correlation between mitotic delay and aberration burden, and their role for the analysis of chromosomal damage. *International Journal of Radiation Biology* 81: 23–32
- Gumrich K, Virsik-Peuckert RP, Harder D. 1986. Temperature and the formation of radiation-induced chromosome aberrations. I. The effect of irradiation temperature. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine* 49:665 – 672.
- International Atomic Energy Agency (IAEA). 2001. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment: A manual. Vienna: IAEA
- Jeggo PA. 1997. DNA-PK: at the cross-roads of biochemistry and genetics. *Mutation Research* 384: 1-14.
- Johannes C, Dixius A, Pust M, Hentschel R, Buraczewska I, Staaf E, Brehwens K, Haghdooost S, Nievaart S, Czub J, Braziewicz J, Wojcik A. 2010. The yield of radiation-induced micronuclei in early and late-arising binucleated cells depends on radiation quality. *Mutation Research* 701: 80–85.
- Kabacik S, Mackay A, Tamber N, Manning G, Finnon P, Paillier F, Ashworth A, Bouffler S, Badie C. 2011. Gene expression following ionizing radiation: identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response. *International Journal of Radiation Biology*. 87:115–129.
- Kempner ES, Haigler HT. 1982. The influence of low temperature on the radiation sensitivity of enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* 257:13297 – 13299.
- Lane D. 1998. Awakening angels. *Nature* 394: 616-617.
- Larsson DE, Gustavsson S, Hultborn R, Nygren J, Delle U, Elmroth K. 2007. Chromosomal damage in two X-ray irradiated cell lines: Influence of cell cycle stage and irradiation temperature. *Anticancer Research* 27:749 – 753.

Levan H, Haas RE, Stefani S, Reyes E. 1970. Radiosensitivity of mice exposed to various temperatures and low-dose rate radiation. *The American Journal of Physiology* 219:1033 – 1035.

Markova E, Schultz N, Belyaev IY. 2007. Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *International Journal of Radiation Biology* 83:319–329.

Mason AJ, Giusti V, Green S, Rosenschold PM, Beynon TD, Hopewell JW. 2011. Interaction between the biological effects of high- and low-LET radiation dose components in a mixed field exposure. *International Journal of Radiation Biology* 87: 1162 – 1172.

Obe G, Beek B. 1984. Human peripheral lymphocytes in mutation research, in: G. Obe (Ed.), *Mutations in Man*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 177–197.

Olaharski AJ, Ji Z, Woo JY, Lim S, Hubbard AE, Zhang L, Smith MT. 2006. The histone deacetylase inhibitor Trichostatin A has genotoxic effects in human lymphoblasts in vitro. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 93: 341 – 347.

Ritter S, Nasonova E, Furusawa Y, Ando K. 2002. Relationship between aberration yield and mitotic delay in human lymphocytes exposed to 200 MeV/u Fe-ions or X-rays. *Journal of Radiation Research. (Tokyo)* 43 (Suppl) S175–S179.

Ryan LA, Smith RW, Seymour CB, Mothersill SE. 2008. Dilution of irradiated cell conditioned medium and the bystander effect. *Radiation Research* 169: 188 – 196.

Savage JRK, Papworth DG. 1973. The effect of variable G2 duration upon the interpretation of yield-time curves of radiation-induced chromatid aberrations. *Journal of Theoretical Biology* 38: 17–38

Sax K, Enzmann EV. 1939. The effect of temperature on X-ray induced chromosome aberrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 25:397 – 405.

Sax K. 1947. Temperature effects on X-ray induced chromosome aberrations. *Genetics* 32:75 – 78.

Szumiel I. 2008. Intrinsic Radiation Sensitivity: Cellular Signaling is the Key. *Radiation Research* 169: 241-258.

Ward JF, Limoli CL, Calabro-Jones PM, Aguilera J. 1991. An examination of the repair saturation hypothesis for describing shouldered survival curves. *Radiation Research* 127: 90 – 96.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Do moich osiągnięć naukowych mogę również zaliczyć udział w opracowaniu programu komputerowego do analizy obrazów i wyników testu kometowego. Program został opublikowany w *Mutation Research* i jest dostępny dla jako program darmowy dla wszystkich użytkowników <http://www.casplab.com>

Końca K, Lankoff A, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, Gózdź S, Koza Z, Wojcik A.
A cross platform public domain PC image analysis program for the comet assay.

Mutation Research 534:15-20, 2003

Liczba cytowań (wg Web of Science) - 380

Uczestniczyłam również w opracowaniu programu komputerowego do analizy obrazów i wyników testu gamma-H2AX. Program umożliwia analizę każdego rodzaju ognisk naprawczych w DNA, wyznakowanych fluorescencyjnie. Program został opublikowany w Mutation Research i jest dostępny dla jako program darmowy dla wszystkich użytkowników <http://focicounter.sourceforge.net>

Jucha A, Wegierek-Ciuk A, Koza Z, Lisowska H, Wojcik A, Wojewodzka M, Lankoff A.
FociCounter: a freely available PC program for quantitative and qualitative analysis of γ -H2AX foci.

Mutation Research 696:16-20, 2010

Liczba cytowań (wg Web of Science) - 38

6. Plany naukowo-badawcze.

Zamierzam w dalszym ciągu prowadzić badania dotyczące ochronnego działania niskiej temperatury na popromienne uszkodzenia DNA. Planuję również kontynuować badania dotyczące działania niskich dawek promieniowania na komórki i organizm w celu identyfikacji biomarkerów ekspozycji i podatności na promieniowanie. Badania te są realizowane we współpracy ze Świętokrzyskim Centrum Onkologii w Kielcach oraz Uniwersytetem w Sztokholmie.

Melina Dirowska