

Prof. dr hab. n. med. Jerzy Wydmański

Gliwice, dnia 26.09.2019 r.

Recenzent pracy doktorskiej

Centrum Onkologii-Instytutu

im. MSC, Oddział w Gliwicach

ul. Wybrzeże AK 15, 44-101 Gliwice

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Zaleskiej

**pt. „Wpływ płynu zebranego z łoży pooperacyjnej po śródoperacyjnym napromienianiu (IORT) guza piersi na populację komórek nowotworowych raka piersi o fenotypie macierzystym CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> oraz ekspresję wybranych miRNA”.**

**Promotor: dr hab. n. med. Dawid Murawa**

**Promotor pomocniczy: dr n. med. Katarzyna Kucenty**

Leczenie oszczędzające piersi jest już standardowym postępowaniem u chorych na wczesnego raka piersi. Początkowo stosowane samodzielne leczenie chirurgiczne wiązało się z wysokim ryzykiem i dużą dynamiką nawrotów miejscowych. Dość wcześnie pojawiła się koncepcja skojarzenia operacji oszczędzającej piersi i radioterapii pooperacyjnej. Radioterapia jest bardzo efektywną metodą leczenia, szczególnie dla subklinicznych ognisk raka. Zastosowanie radioterapii pooperacyjnej powoduje zmniejszenie ryzyka nawrotu miejscowego i regionalnego. W praktyce klinicznej u chorych na inwazyjnego raka piersi najczęściej stosuje się radioterapię na obszar całej piersi. W wielu lokalizacjach nowotworów standardowo stosuje się podwyższenie dawki (ang. boost) w łoży po guzie, w celu obniżenia ryzyka wznowy miejscowej i poprawy szansy na miejscowe wyleczenie. W bliskim otoczeniu łoży po guzie należy spodziewać się większej liczby klonogennych komórek nowotworowych, aniżeli w pozostałym gruczole piersiowym. Krzywa zależności dawka-efekt ma przebieg sigmoidalny. W jej stromym odcinku podwyższenie dawki o kilka grejów może spowodować wzrost szansy na miejscowe wyleczenie o kilka lub nawet o kilkanaście procent. Jedną ze metod podwyższenia dawki w łoży po guzie jest radioterapia śródoperacyjna (RTŚO), która polega na zastosowaniu napromieniania w trakcie operacji. Racjonalną przesłanką dla tej metody leczenia jest możliwość podania wysokiej jednorazowej dawki promieniowania w łoży po guzie piersi, która pozwala nie tylko na poprawę miejscowego wyleczenia, ale również wpływa na zmniejszenie ryzyka odczynów popromiennych, w konsekwencji poprawiając indeks terapeutyczny. Bezpośredni dostęp do łoży pooperacyjnej istotnie zmniejsza ryzyko popełnienia błędu geograficznego i daje prawie pewność, że zaplanowana dawka zostanie podana precyzyjnie w obszarze najwyższego ryzyka wznowy miejscowej. Radioterapia śródoperacyjna nabiera szczególnego znaczenia w dobie coraz powszechniej stosowanych operacji onkoplastycznych, po których identyfikacja łoży po guzie jest bardzo trudna. Zaletą RTŚO jest możliwość oszczędzania zdrowych tkanek i narządów, która wynika zarówno z charakterystyki stosowanego promieniowania (szybko zanika wraz z głębokością), jak również z możliwości odsunięcia tkanek z obszaru o wysokiej dawce oraz ich osłaniania. Co więcej, radioterapia śródoperacyjna pozwala na przeprowadzenie operacji i zastosowanie leczenia promieniami w ciągu jednego dnia, co skraca całkowity czas leczenia o około tydzień, w związku z tym - poza korzystnym efektem terapeutycznym i kosmetycznym - technika ta przynosi spore korzyści ekonomiczne i logistyczne, w porównaniu do radioterapii konwencjonalnej, stosowanej zwyczajowo przez okres 5-6 tyg. Radiobiologiczne i immunologiczne aspekty podania jednorazowej wysokiej dawki w łoży po guzie są



przedmiotem intensywnych badań. W tym kontekście dokonany wybór przez Doktorantkę tematu pracy doktorskiej jest właściwy i obiecujący.

Rozprawa doktorska składa się z cyklu trzech oryginalnych publikacji w recenzowanych czasopismach medycznych o uznanej międzynarodowej renomie, tworzących spójną i logiczną całość. W dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Układ pracy i strona edytorska nie budzą zastrzeżeń.

Wykaz publikacji wchodzący w skład rozprawy doktorskiej:

1. Zaleska, K., Suchorska, W.M., Przybyła, A., & Murawa, D. (2016). Effect of surgical wound fluids after intraoperative electron radiotherapy on the cancer stem cell phenotype in a panel of human breast cancer cell lines. *Oncology Letters*, 12, 3707-3714. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.516>
2. Zaleska, K., Przybyła, A., Kulcenty, K., Wichtowski, M., Mackiewicz, A., Suchorska, W., & Murawa, D. (2017). Wound fluids affect miR-21, miR-155 and miR-221 expression in breast cancer cell lines, and this effect is partially abrogated by intraoperative radiation therapy treatment. *Oncology Letters*, 14, 4029-4036. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6718>
3. Kulcenty, K.I., Piotrowski, I., Zaleska, K., Murawa, D., Suchorska, W.M. Wound fluids collected from patients after IORT treatment activates extrinsic apoptotic pathway in MCF7 breast cancer cell line. *Ginekol Pol.* 2018;89(4):175-182. doi: 10.5603/GP.a2018.0030.

We wstępie Doktorantka omówiła metody leczenia chorych na raka piersi, ze szczególnym uwzględnieniem radioterapii śródoperacyjnej. Kolejnym zagadnieniem poruszonym w tym rozdziale jest wpływ płynu pobranego z łoża pooperacyjnej na proliferację komórek raka piersi w warunkach in vitro. Dalej Autorka omawia rolę komórek macierzystych raka piersi w kontekście niepowodzenia leczenia, w tym rozwoju chemio- i radio-oporności. Następnie przedmiotem rozważań są zagadnienia związane z wpływem mikroRNA na regulację procesów komórkowych. Doktorantka wskazuje na potencjalne prognostyczne i terapeutyczne znaczenie miRNA w chorobach nowotworowych. W mojej ocenie tematy poruszane we wstępie zostały przedstawione w sposób logiczny i wyczerpujący pod względem merytorycznym.

Cele pracy zostały określone precyzyjnie i dotyczyły wpływu płynu pooperacyjnego na populację komórek macierzystych oraz poziom ekspresji wybranych miRNA w liniach komórkowych raka piersi.

W metodyce pracy Doktorantka omówiła sposób pozyskiwania płynu pooperacyjnego od chorych na raka piersi oraz sposób jego przygotowania do prac badawczych. Ponadto w sposób syntetyczny zostały omówione metody doświadczalne zastosowane w badaniach. Doktorantka trafnie dobrała metody i narzędzia badawcze oraz wykazała się umiejętnością ich zastosowania.

W pierwszej publikacji Doktorantka oceniła wpływ płynu pooperacyjnego uzyskanego w grupie chorych po samodzielnej operacji i w grupie chorych leczonych po śródoperacyjnej radioterapii na populację komórek macierzystych rak piersi o fenotypie CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>. W grupie po radioterapii płyn stymulował wzrost populacji komórek macierzystych w mniejszym stopniu niż w grupie po samodzielnej operacji. Chociaż efekt ten nie dotyczył wszystkich badanych linii komórkowych. W pracy tej również badano wpływ płynów pooperacyjnych aktywność ALDH1 w hodowlach komórkowych. Zastosowanie radioterapii śródoperacyjnej znamienne wpływało na zmniejszenie aktywności ALDH1.

W drugim artykule Doktorantka zbadała oddziaływanie płynów pooperacyjnych na poziom ekspresji wybranych miRNA w hodowlach komórkowych raka piersi. Co ciekawe, zaobserwowano odmienny efekt biologiczny w zależności od typu molekularnego raka piersi. W podtypie bazalno/mezynchymalnym (linia BT-549) stwierdzono spadek ekspresji miR-155 związanego z migracją i inwazyjnością nowotworu. Natomiast linie komórkowe bazalno/epitelialna MDA-MB-231 i luminalna MCF-7 wykazywały obniżony poziom ekspresji badanych miRNA. Ponadto linia komórkowa SK-BR-3 z nadekspresją receptorów HER-2 wykazywała wzrost ekspresji wszystkich badanych miRNA, z tym że mniejszy w grupie po śródoperacyjnej radioterapii.

W ostatniej publikacji Doktorantka zbadała ekspresję genów związanych z apoptozą w wybranej linii komórkowej po zastosowaniu płynów pooperacyjnych. Interesującą obserwacją jest podwyższona ekspresja genów związanych z zewnętrznym szlakiem apoptotycznym szczególnie w grupie po radioterapii śródoperacyjnej. Natomiast stwierdzono nadekspresję tylko jednego genu (CASP9) zaangażowanego w wewnętrzny szlak apoptozy.



Rozprawa doktorska **mgr Karoliny Zaleskiej pt. „Wpływ płynu zebranego z łoża pooperacyjnej po śródoperacyjnym napromienianiu (IORT) guza piersi na populację komórek nowotworowych raka piersi o fenotypie macierzystym CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup> oraz ekspresję wybranych miRNA”** jest bardzo ważnym i interesującym opracowaniem naukowym oceniającym wpływ płynu pooperacyjnego pobranego od chorych na raka piersi na komórki nowotworowe w warunkach in vitro. Przedstawiony cykl publikacji znakomicie wpisuje się w światowy trend badań nad biologicznymi właściwościami płynu pooperacyjnego uzyskanego po przeprowadzeniu radioterapii śródoperacyjnej. Rozprawa doktorska jest nie tylko cennym uzupełnieniem dotychczasowej wiedzy w tym zakresie, ale prezentuje duży potencjał translacyjny. Wyniki powinny wpłynąć na dalszą popularyzację radioterapii śródoperacyjnej jako niezbędnego elementu skojarzonego leczenia oszczędzającego piersi.

Doktorantka wykazała się właściwą wiedzą teoretyczną oraz umiejętnościami praktycznymi w temacie prowadzonych samodzielnych oryginalnych badań naukowych. Zatem rozprawa doktorska spełnia kryteria jakości określone w ustawie o tytułach i stopniach naukowych. Z pełnym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej o dopuszczenie mgr Karoliny Zaleskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

5766328 prof. n. med. Jerzy Wydmański  
- specjalista  
onkolog radioterapeuta

