

Poznań, 23.08.2018

Dr hab. n. med. Jacek Mackiewicz
Oddział Onkologii Klinicznej i Doświadczalnej
Szpital Kliniczny im. H. Święcickiego w Poznaniu,
Katedra Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu;
Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów
Wielkopolskie Centrum Onkologii

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Zaleskiej pt.: „Wpływ płynu zabranego z
łoży pooperacyjnej po śródoperacyjnym napromienianiu (IORT) guza piersi na
populację komórek nowotworowych raka piersi o fenotypie macierzystym CD24/CD44⁺
oraz ekspresję wybranych miRNA” – cykl publikacji monotematycznych**

**Promotor: dr hab. n. med. Dawid Murawa
Promotor pomocniczy: dr n. med. Katarzyna Kulcenty**

Rak piersi jest najczęściej diagnozowaną chorobą nowotworową oraz drugą najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów u kobiet w Polsce. Obecnie standardem leczenia wczesnego raka piersi jest oszczędzający zabieg chirurgiczny z uzupełniającą radioterapią. Jedną z możliwości jest zastosowanie radioterapii śródoperacyjnej pozwalającej na podwyższenie jednorazowej dawki terapeutycznej, co powoduje skrócenie czasu trwania pooperacyjnej radioterapii. Obecnie wiemy, że zabieg chirurgiczny wpływa na mikrośrodowisko miejsca operowanego, w którym dochodzi do reakcji zapalnej, która może stymulować progresję nowotworu. Choć mechanizmy leżące u podstawy tych procesów nie są w pełni poznane. Te obserwacje sugerują, że płyn zbierający się w łożu pooperacyjnej po usunięciu nowotworu może być istotnym czynnikiem indukującym nawrót miejscowy lub rozsiew choroby nowotworowej. Wcześniejsze badania wykazały, że zbierający się płyn pooperacyjny w łożu po resekcji chirurgicznej raka piersi, inkubowany *in vitro* z komórkami raka piersi stymuluje ich proliferację. Ponadto wykazano, że płyn pooperacyjny pochodzący od chorych po leczeniu operacyjnym skojarzonym z śródoperacyjnym napromienianiem (IORT) w niższym stopniu indukował proliferację oraz inwazyjność komórek nowotworowych niż płyn pobrany od kobiet, u których wykonano zabieg bez skojarzonej IORT.

Przedłożona do recenzji rozprawa magister Karoliny Zaleskiej pt.: „Wpływ płynu zabranego z łoży pooperacyjnej po śródoperacyjnym napromienianiu (IORT) guza piersi na

populację komórek nowotworowych raka piersi o fenotypie macierzystym CD24⁺/CD44⁺ oraz ekspresję wybranych miRNA”, której promotorem jest Dr hab. n. med. Dawid Murawa, jest cyklem tematycznie powiązanych trzech publikacji:

1. Zaleska K, Suchorska WM, Przybyła A, Murawa D. Effect of surgical wound fluids after intraoperative electron radiotherapy on the cancer stem cell phenotype in a panel of human breast cancer cell lines. *Oncol Lett.* 2016 Nov;12(5):3707-3714
2. Zaleska K, Przybyła A, Kulcenty K, Wichtowski M, Mackiewicz A, Suchorska W, Murawa D. 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. *Oncol Lett.* 2017 Oct;14(4):4029-4036.
3. Kulcenty KI, Piotrowski I, Zaleska K, Murawa D, Suchorska WM. 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.

W dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, w jednej trzecim. Łączny *Impact Factor* prac wynosi 3,801.

Przedłożony do recenzji cykl publikacji jest monotematyczny, trzy manuskrypty są ze sobą powiązane tematycznie i mają wysoka wartość merytoryczną. Wszystkie zostały opublikowane w czasopismach posiadających *Impact Factor*.

We wszystkich trzech publikacjach wykorzystano tę samą grupę chorych. Były to 44 kobiety leczone z powodu raka piersi. Pierwsza grupa 22 chorych została poddana leczeniu chirurgicznemu tj. zabiegowi oszczędzającemu pierś w skojarzeniu z IORT. Drugą grupę stanowiły 22 chore poddane tylko leczeniu chirurgicznemu. Po 7 dniach od zabiegu, gdy w łożu pooperacyjnej znajdował się płyn był on pobierany do badań *in vitro*.

W pierwszej publikacji Doktorantka wraz ze współautorami oceniła wpływ płynu pooperacyjnego na populację linii komórkowych ludzkiego raka piersi o fenotypie macierzystym CD44⁺/CD24⁺. Wyniki badań wykazały, że inkubacja komórek z płynem pooperacyjnym po zastosowaniu techniki IORT wiąże się ze zmniejszeniem populacji komórek o fenotypie macierzystym w porównaniu do grupy kontrolnej (inkubacja komórek w medium hodowlanym bez dodatku płynu pooperacyjnego). Odwrotny skutek, tj. wzrost



komórek o fenotypie macierzystym wiązał się z inkubacją płynu po standardowym leczeniu chirurgicznym (czyli bez IORT). Ponadto, Doktorantka wykazała, że płyny pooperacyjne stymulowały wzrost innego markera macierzystości ALDH1 w porównaniu do kontroli. Przy czym indukcja ta była niższa w przypadku płynów pochodzących od chorych poddanych zabiegowi chirurgicznemu w połączeniu z IORT.

W drugiej publikacji oceniono wpływ płynów pooperacyjnych po zastosowaniu IORT na poziom ekspresji trzech microRNA (miRNA) – miRNA-21, miRNA-155, miRNA-221. Ekspresję miRNA oznaczono w 4 liniach komórkowych ludzkiego raka piersi prezentujących 3 podtypy molekularne w zależności od statusu receptorów hormonalnych (estrogenowych i progesteronowych) i HER2. W linii komórkowej podtypu bazalno/mezenchymalnego BT-549 po inkubacji z płynami pooperacyjnymi zaobserwowano spadek ekspresji miRNA-155, które jest związane z migracją i inwazyjnością raka piersi. W linii komórkowej prezentującej nadekspresję HER2 (SK-BR-3) zaobserwowano nadekspresję wszystkich trzech miRNA, jednak po inkubacji z płynem pochodzącym od chorych dodatkowo otrzymujących IORT obserwowano niższy wzrost ekspresji niż u chorych, u których przeprowadzono zabieg chirurgiczny bez IORT. Linia komórkowa bazalno/epitelialna MDA-MB-231 oraz linia luminalna MCF-7 wykazały obniżony poziom ekspresji ocenianych miRNA zarówno po inkubacji z płynem pochodzącym od chorych poddanych zabiegowi chirurgicznemu w skojarzeniu z IORT, jak i u chorych leczonych jedynie chirurgicznie. Doktorantka wykazała, że płyn pooperacyjny ma wpływ na poziom ekspresji badanych miRNA, które są powiązane z cechami agresywności nowotworu tj. inwazyjność, przerzutowanie, migracja, proliferacja czy apoptoza. Ponadto, zmiany ekspresji są powiązane z podtypem molekularnym.

W trzeciej publikacji oceniono wpływ płynu pooperacyjnego pobranego od chorych poddanych leczeniu chirurgicznemu w połączeniu z IORT na aktywację apoptozy w linii komórkowej raka piersi (MCF-7). Wyniki badania wykazały podwyższoną ekspresję genów zaangażowanych w zewnętrzny szlak apoptozy w przypadku komórek poddanych inkubacji płynem pochodzącym od chorych, u których przeprowadzono zabieg operacyjny z IORT w porównaniu do płynu pochodzącego od chorych, u których przeprowadzono jedynie resekcję chirurgiczną oraz w porównaniu do grupy kontrolnej hodowanej w standardowej pożywce.

Jednak dla lepszego zrozumienia lokalnych mechanizmów zachodzących w łożu pooperacyjnej wartościowe by było określenie pewnych składników płynu pooperacyjnego mających wpływ na oceniane przez Doktorantkę procesy biologiczne tj. stymulacja nowotworowych komórek macierzystych, wpływ na ekspresję poszczególnych microRNA czy aktywacja apoptozy w komórkach nowotworowych. Takie odkrycie mogłoby pomóc

h

wyjaśnić zachodzące procesy biologiczne indukujące wznową miejscową jak i rozsiewem nowotworu. Ponadto, również w przyszłości mogłoby wpłynąć na znalezienie czynników prognostycznych czy predykcyjnych u chorych na raka piersi poddanych terapii. Jednak nie zmienia to faktu, że przedstawione wyniki znacząco uzupełniają stan wiedzy o biologicznej odpowiedzi na zastosowaną radioterapię śródoperacyjną co przyczyni się do skuteczniejszego planowania leczenia u kobiet chorych na raka piersi.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska z cyklu publikacji spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim wymagane w Ustawie o Stopniach i Tytule Naukowym.

Z dużym uznaniem dla umiejętności i wiedzy Doktorantki zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego, ponadto z racji wysokiej wartości naukowej rozprawy w mojej ocenie powinna być wyróżniona.

Dr hab. n. med. Jacek Mackiewicz

