

Szczecin, 11.08.2025

dr hab. n. med. Michał Falco
Oddział Kliniczny Radioterapii PUM
Zachodniopomorskie Centrum Onkologii
71-730 Szczecin, ul. Strzałowska 22

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

Pani mgr Mariki Musielak zatytułowanej: „Analiza odpowiedzi biologicznej komórek nowotworowych piersi na promieniowanie protonowe z uwzględnieniem mikrośrodowiska guza”.

Przedstawiona rozprawa jest podsumowaniem ciągu 4 publikacji przedstawionych w recenzowanych czasopismach naukowych:

1. Musielak M, Suchorska W, Fundowicz M, Milecki P, Malicki J. Future Perspectives of Proton Therapy in Minimizing the Toxicity of Breast Cancer Radiotherapy. *J Pers Med.* 2021 May 13;11(5):410
2. Musielak M, Piwocka O, Kulcenty K, Ampuła K, Adamczyk B, Piotrowski I, Fundowicz M, Kruszyna-Mochalska M, Suchorska W, Malicki J. Biological heterogeneity of primary cancer-associated fibroblasts determines the breast cancer microenvironment. *Am J Cancer Res* 2022;12(9):4411-4427
3. Musielak M, Graczyk K, Liszka M, Papalanis E, Suchorska W, Piotrowski T, Stenerlöv B, Malicki J. Heterogeneity in biological response of MDA-MB-231 cells after proton irradiation along different parts of the depth-dose curve: before, within, and behind the Bragg peak. *Rep Pract Oncol Radiother* 2024;29(4):478–487
4. Musielak M, Graczyk K, Liszka M, Christou A, Rosochowicz M, Lach MS, Adamczyk B, Suchorska W, Piotrowski T, Stenerlöv B, Malicki J. Impact of proton irradiation depending breast cancer subtype in patient-derived cell lines. *Int J Mol Sci.* 2024 Sep 29;25(19):10494

Wymienione publikacje przedstawiają wyniki badań nad biologiczną odpowiedzią komórek rak piersi i podścieliska na ekspozycję na promieniowanie protonowe.

Radioterapia, jako forma miejscowego leczenia uzupełniającego po radykalnym leczeniu operacyjnym, ma zastosowanie u ponad 50% chorych z nowotworem złośliwy piersi. Najczęściej stosowane jest napromienianie z wykorzystaniem promieniowania fotonowego. Napromienianie protonowe, ze względu na cenę i dostępność metody, jest wykorzystywane znacznie rzadziej. Słusznie Autor wskazuje, że ze względu na właściwości fizyczne promieniowania, napromienianie z wykorzystaniem protonów może wiązać się z niższą toksycznością dla organów klatki piersiowej takich jak serce, czy płuca. Zgodnie z publikacją numer 1 brak jest danych porównawczych na dużych grupach dla opisanego wielkości korzyści klinicznej z zastosowania radioterapii protonowej w leczeniu pooperacyjnym pacjentek z

rakiem piersi. W oparciu o publikację 1 stwierdzam, że Autor prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną na odpowiednim poziomie.

Charakterystyka promieniowania protonowego wymusza określony sposób planowania i dostarczenia dawki promieniowania jonizującego, czyli poszerzony pik Bragga (ang. spread-out bragg peak, SOBP), który tworzony jest poprzez superpozycje pojedynczych pików.

W prezentowanej pracy Autor uwzględnia podział na typy molekularne raka piersi w oparciu o badania immunohistochemiczne obecności receptorów dla estrogenów, progesteronu, naskórkowego receptora wzrostu 2 oraz indeksu proliferacji w oparciu o oznaczenie białka ki-67. Podtypy molekularne raka piersi pełnią funkcję predykcyjną i prognostyczną w zakresie ryzyka nawrotu miejscowego, odległego i czasu przeżycia. Dotychczasowe badania „in vitro” nie wykazały istotnych różnic w promieniowrażliwości pomiędzy różnymi podtypami molekularnymi.

Interakcja pomiędzy komórkami nowotworu złośliwego i komórkami podścieliska jest istotnym i mało poznanym procesem mającym wpływ na odpowiedź guza nowotworowego na napromienianie.

Autor zdefiniowała cele szczegółowe:

1. Ocena odpowiedzi biologicznej komórek nowotworowych piersi po ekspozycji na promieniowanie protonowe w różnych lokalizacjach wzdłuż krzywej Bragga.
2. Optymalizacja i analiza modelu biologicznego składającego się z pierwotnych linii komórkowych izolowanych z tkanki guza i skóry chorych na raka piersi,
3. Analiza odpowiedzi radiobiologicznej komórek tworzących guza nowotworowego uwzględniając czynniki molekularne i mikrośrodowiskowe guza mających istotny wpływ na odpowiedź biologiczną guza przy napromienianiu promieniowaniem protonowym.

W publikacji nr 2 przedstawiono sposób opracowania metodologii izolacji oraz charakterystyki komórek tworzących mikrośrodowisko guza nowotworowego piersi: fibroblastów związanych z nowotworem (ang. cancer associated fibroblasts, CAF). Przedmiotem analizy były materiały tkankowe pobrane z guzów piersi o rozmiarze co najmniej 15 mm. Analizie poddano materiały tkankowe pobrane od 14 pacjentek z guzami o podtypach molekularnych rak luminalnego A, luminalnego B i z nadekspresją receptora Her-2. W publikacji brak jest informacji o tym czy pacjentki były poddawane wstępnej chemioterapii. Brak pacjentek z rakiem trójujemnym wskazuje, że były to pacjentki poddane pierwotnemu leczeniu operacyjnemu. W przedstawionej publikacji brak jest jasno przedstawionych kryteriów podziału pacjentek na typ luminalny A i B (np., odsetek komórek raka z obecnością receptora dla progesteronu i wartości indeksu proliferacyjnego ki-67), np. pacjentka nr 5 (rak luminalny A) ma taką samą charakterystykę receptorową jak pacjentki nr 2 i 3. W badanej grupie nie wskazano wyraźnego wzorca w klasyfikacji CAF. Poziomy ekspresji białek były wysoce niejednorodne, w wyniku czego specyficzne podtypy CAF nie zostały jasno określone. W podziale na podtypy molekularne raka piersi nie wykazano wyraźnego wzoru ekspresji. Brak precyzyjnego wskazania kryteriów podziału na typy raka luminalnego A i B nie mogły mieć wpływu na wynik badania. Istotnym osiągnięciem związanym z przedstawionym badaniem było uzyskanie stabilnego modelu linii komórkowych CAF oraz ich szeroką charakterystykę.

W publikacji 3 dokonano analizy i oceny różnicy w odpowiedzi radiobiologicznej ustalonej linii komórkowej raka piersi (MDA-MB-231) na ekspozycję monoenergetyczną wiązką protonową i fotonową w różnych lokalizacjach wzdłuż krzywej rozkładu głębokościowego dawki. Napromieniane komórki raka piersi należą do typu molekularnego raka trójujemnego.

W publikacji numer 2 nie analizowano guzów z wymienionym profilem molekularnym. Parametrem odpowiedzi był odsetek komórek przeżywających (SF). Metodologia badania i pomiarów świadczą o wysokiej precyzji i zrozumieniu problematyki, nie budzą żadnych wątpliwości. W zależności od miejsca na krzywej dawki procentowej na głębokości, dla protonów ta sama dawka 5Gy wywoływała różny efekt biologiczny w postaci uzyskanych wartości SF od 26% na początku krzywej 16-17% w obszarze piku Bragga i poza nim. Dla promieniowania fotonowego wymienione wartości były stabilne z wartościami SF od 23% do 26%. Oznaczenia γ H2AX wykazały wyższe wartości dla obszaru piku Bragga i poza nim, wskazując na większy odsetek podwójno niciowych pęknięć DNA. Przedstawione wyniki potwierdzają wcześniejsze dane wskazujące na wyższą wartość LET dla promieniowania protonowego w porównaniu do fotonowego, oraz rosnącą wartość LET w obszarze poza pikiem Bragga. Istotną informacją są dane dotyczące względnej skuteczności biologicznej promieniowania protonowego w rejonach procentowej dawki na głębokości przed pikiem Bragga. Są to istotne informacje, które powinny być elementem systemów planowania leczenia.

W publikacji 4 przeprowadzono oceny odpowiedzi radiobiologicznej mikrośrodowiska guza w modelu biologicznym stanowiącym linie pierwotne: nowotworową, CAF oraz fibroblasty skórne (ang. *normal fibroblasts*, NF) na promieniowanie protonowe dostarczone techniką aktywnego skanowania. Nie wykazano istotnych różnic w promieniowrażliwości pomiędzy komórkami raka trójjemnego (MDA-MB-231), luminalnego A (MCF-7), oraz wyprowadzonej linii komórkowej BC239 (Luminalny A). Linia komórkowa BC239 charakteryzowała się wysoką promieniowrażliwością. Linie komórkowe CAF wyizolowane z tkanki guza o określonym podtypie molekularnym wykazały różną odpowiedź radiobiologiczną. Najbardziej wrażliwą na promieniowanie była linia CAF wyizolowana z tkanki guza o podtypie molekularnym luminalnym A. W przypadku linii wyprowadzonej z tkanki guza o podtypie potrójnie negatywnym wykazano, że jest ona znacząco radiooporna. Różne typy CAF wyizolowane z nowotworu o jednym typie molekularnym różniły się promieniowrażliwością. Potwierdzono hipotezę, że reakcja komórek mikrośrodowiska guza na napromieniowanie protonowe może mieć wpływ na odpowiedź guza na ekspozycję. Dla NF pobranych od pacjentek z różnymi podtypami molekularnymi raka piersi obserwowano istotnie statystycznie różną odpowiedź dla dawki 2Gy, podczas gdy dla dawek 4 i 6 Gy te różnice były nieistotne statystycznie.

Praca napisana jest w sposób zrozumiały i czytelny. Zawiera najważniejsze wnioski z przeprowadzonych badań i opublikowanych wyników. Uzyskane wyniki korespondują z danymi z wcześniejszych badań innych autorów, a wielu aspektach stanowią dalsze ich rozwinięcie.

Z najistotniejszych wniosków pragnę wskazać:

1. Względna skuteczność promieniowania protonowego ulega zmianie wraz z procentową dawką na głębokości. Istotna wiadomość z punktu projektowania systemów planowania leczenia i interpretacji tych planów.
2. Sposób odpowiedzi komórek raka piersi różni się w zależności od typu zastosowanego promieniowania: protonowego lub fotonowego. Wymaga to znacznej ostrożności przy przenoszeniu schematów napromieniania z wykorzystaniem promieniowania fotonowego na zastosowanie promieniowania protonowego.
3. Promieniowrażliwość linii komórkowych uzyskanych z guzów o różnym typie molekularnym nie różni się w sposób istotny statystycznie.
4. Komórki CAF pozyskane z guzów o różnym typie molekularnym różnią się istotnie promieniowrażliwością. Należy jednak pamiętać o tym, że w większości przypadków radioterapia u pacjentek z rakiem piersi realizowana jest po operacji. W związku z tym

ważną informacją jest jaki skład ma podścielisko w loży po usuniętym guzie nowotworowym.

W podsumowaniu rozprawa ma znaczenie w aspekcie rozwoju badań podstawowych nad biologią nowotworów i oddziaływania promieniowania jonizującego. Przedstawione wyniki są także istotne z punktu widzenia praktyki klinicznej.

Praca napisana jest zgodnie z obecnie obowiązującymi wytycznymi dla rozpraw doktorskich i spełnia wymogi Ustawy o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (tekst jednolity Dz. U. z 2024 r. poz. 1571, Art. 186-187 z dnia 24.10.2024).

Zwracam się do Pana Przewodniczącego i Rady Kolegium Nauk Medycznych o dopuszczenie Pani mgr Mariki Musielak do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie prezentowanej rozprawy.

dr hab. n. med. Michał Falco

