

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Mariki Musielak

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

Na rozprawę doktorską mgr Mariki Musielak składa się cykl czterech publikacji:

Publikacja 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

Publikacja 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

Publikacja 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

Publikacja 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

Celem ogólnym rozprawy postawionej przez Doktorantkę była ocena odpowiedzi radiobiologicznej ustalonych linii raka piersi oraz pierwotnych linii komórkowych tworzących guz nowotworowy, na promieniowanie protonowe oraz określenie związku odpowiedzi biologicznej z czynnikami molekularnymi i mikrośrodowiskowymi u chorych na raka piersi.

Cele szczegółowe rozprawy obejmowały:

1. Ocenę odpowiedzi biologicznej komórek nowotworowych raka piersi po ekspozycji na promieniowanie protonowe w różnych lokalizacjach wzdłuż krzywej Bragga.
2. Optymalizację i analizę modelu biologicznego składającego się z pierwotnych linii komórkowych izolowanych z tkanki guza i skóry chorych na raka piersi,
3. Analizę odpowiedzi radiobiologicznej komórek tworzących guz nowotworowy z uwzględnieniem czynników molekularnych i mikrośrodowiskowych, mających istotny wpływ na odpowiedź biologiczną guza przy napromienianiu promieniowaniem protonowym.

Wysoko oceniam wybór tematyki badawczej, gdyż poszukiwanie sposobów zmniejszenia ryzyka późnych skutków radioterapii w aspekcie występowania efektów deterministycznych lub stochastycznych jest krytycznie ważne u chorych o spodziewanym długim przeżyciu a do takich należy większość pacjentek z rozpoznaniem raka piersi. Dodatkowo, w tej grupie chorych, zależność odpowiedzi radiobiologicznej po napromienianiu wiązką protonów z danym podtypem molekularnym nowotworu może dostarczyć informacji o predysponowaniu do leczenia tym rodzajem radioterapii. Bez wątpienia wiedza z zakresu aspektów technicznych radioterapii protonowej, efektów fizycznych, biologicznych związanych z rozkładem dawki oraz indywidualnymi czynnikami molekularnymi i mikrośrodowiskowymi guza jest kluczowa dla poprawy efektywności leczenia i zmniejszenia ryzyka kardiotoksyczności, będącej głównym ograniczeniem radioterapii w tej lokalizacji anatomicznej.

W 2020 roku mgr Musielak wygrała konkurs na stanowisko doktoranta w projekcie OPUS finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) pt. „Indywidualna odpowiedź biologiczna guza w raku piersi na promieniowanie protonowe w zależności od czynników molekularnych i mikrośrodowiska.” (2019/35/B/NZ7/04342) realizowanym pod kierownictwem prof. dr hab. Juliana Malickiego. W istotnej części przygotowanie publikacji składających się powyższy cykl, było wynikiem realizacji powyższego grantu naukowego.

Doktorantka przed przeprowadzeniem badania uzyskała także pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr 619/20; 283/21).

W **publikacji 1** mgr Musielak dokonała analizy i oceny aktualnych doniesień literaturowych z zakresu leczenia raka piersi z wykorzystaniem radioterapii protonowej. W pracy przytoczono dane podkreślające zasadność rozważenia protonoterapii, jako skutecznej metody ograniczającej kardiotoxycznosc podczas napromieniania chorych na raka piersi.

Publikacja 2 dotyczyła opracowania metodologii izolacji oraz charakterystyki komórek tworzących mikrośrodowisko guza nowotworowego piersi: fibroblastów związanych z nowotworem (CAF). Doktorantka zbadała możliwość wyodrębnienia różnych podtypów CAF i określenia ich potencjalnej korelacji z danymi histologicznymi chorych na raka piersi.

W **publikacji 3** mgr Musielak dokonała analizy i oceny różnicy w odpowiedzi radiobiologicznej ustalonej linii komórkowej raka piersi na ekspozycje monoenergetyczną wiązką protonową w różnych lokalizacjach wzdłuż krzywej rozkładu głębokościowego dawki.

W **publikacji 4** Doktorantka przeprowadziła ocenę odpowiedzi radiobiologicznej mikrośrodowiska guza w modelu biologicznym stanowiącym linie pierwotne: nowotworową, CAF oraz fibroblasty skórne (NF) na promieniowanie protonowe dostarczone techniką aktywnego skanowania. Przeprowadzona analiza porównawcza dotyczyła określenia radiowrażliwości między poszczególnymi podtypami molekularnymi raka piersi.

Przeprowadzone eksperymenty oraz analizy umożliwiły Doktorantce wykazanie heterogenności uszkodzeń biologicznych wewnątrz objętości tarczowej guza nowotworowego. Wiązka protonowa spowodowała większą liczbę uszkodzeń w komórkach raka piersi, które zostały napromienione na większych głębokościach. Doktorantka wykazała prawdopodobieństwo istnienia zróżnicowanej odpowiedzi biologicznej w objętości nowotworu po napromienieniu jednorodną dawką protonową, ze względu na indukowanie większej liczby DSB DNA za pikiem Bragga niż przed lub w pikie Bragga. Wysnuła wniosek, że reakcja biologiczna w objętości tarczowej guza napromienionej jednorodną dawką protonów może być bardziej zróżnicowana z powodu nakładania się wielu pików Bragga, gdyż różne rodzaje interakcji promieniowania protonowego z materią zachodzące w różnych częściach krzywej procentowej dawki głębokościowej, powodują heterogenną odpowiedź radiobiologiczną. Prawdopodobieństwo występowania wyższej liczby uszkodzeń na dalszych głębokościach wzdłuż PDD, może też powodować większe ryzyko uszkodzenia tkanek zdrowych za objętością tarczową. **Jest to bardzo istotne stwierdzenie z punktu klinicznej radioterapii.**

Izolacja pierwotnych linii komórkowych CAF z tkanki nowotworowej oraz ich charakterystyka pozwoliły Doktorantce na ustalenie i opracowanie modelu komórkowego do dalszych badań. Mimo, że nie wyodrębniono 26 podtypów molekularnych w grupie linii CAF, zaobserwowane zróżnicowanie fenotypu wyizolowanych linii CAF wskazało na dużą rolę czynników molekularnych swoistych dla danego chorego. Model biologiczny, na który składały się różne pierwotne linie komórkowe umożliwił zbadanie różnic w odpowiedzi radiobiologicznej populacji komórek tworzących guz nowotworowy na wiązkę protonową. Na tej podstawie, w dalszych etapach pracy, możliwe było określenie związku między odpowiedzią radiobiologiczną a czynnikami molekularnymi i mikrośrodowiskowymi guza. Doktorantka potwierdziła, że czynniki swoiste dla danego chorego modyfikują odpowiedź radiobiologiczną na promieniowanie protonowe, co wskazuje na istotny wpływ sąsiedztwa komórek nowotworowych na modyfikacje otaczających tkanek. Zaobserwowane różnice pomiędzy liniami ustalonymi i pierwotnymi wykazały konieczność wprowadzenia większej liczby modeli eksperymentalnych opartych na liniach izolowanych z tkanek chorego, gdyż różnica między odpowiedzią linii ustalonych i pierwotnych była znacząca.

Dokonana przez Doktorantkę analiza danych literaturowych i uzyskane wyniki podkreślają potrzebę personalizacji terapii w zależności od rodzaju oraz cech histopatologicznych guza, jak również anatomii chorego zakwalifikowanego do leczenia terapią protonową. Analiza czynników molekularnych i mikrośrodowiska guza dokonana przez mgr Musielak wskazała ich istotny wpływ na odpowiedź biologiczną guza nowotworowego przy napromienianiu wiązką promieniowania protonowego. **Przeprowadzone przez Doktorantkę badania są dobrą podstawą do dalszej optymalizacji wskazań do stosowania terapii protonowej.**

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że badania dr Mariki Musielak mają istotne znaczenie naukowe i kliniczne ze względu na pogłębienie wiedzy na temat oddziaływania wiązki promieniowania protonowego na tkankę guza nowotworowego i jego mikrośrodowiska z uwzględnieniem czynników molekularnych charakteryzujących raka piersi.

Wszystkie publikacje z przedstawionego cyklu były opublikowane w recenzowanych pismach a Doktorantka jest ich pierwszym autorem. Udział w publikacjach innych autorów

miał charakter pomocniczy lub techniczny a Doktorantka była ich rzeczywistą pomysłodawczynią i wykonawczynią.

Mgr Marika Musielak jest absolwentką kierunku fizyka medyczna na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Pracę licencjacką pt. „Ocena wpływu dawki i mocy promieniowania jonizującego na komórki raka piersi” wykonała w Pracowni Radiobiologii Wielkopolskiego Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Poznaniu (WCO). Kontynuując działalność naukową w Pracowni Radiobiologii, odbyła praktyki zawodowe oraz trzymiesięczny staż naukowy (POWR.03.01.00-00-S157/17). W 2019 rozpoczęła badania nad oceną wpływu nanocząstek złota na komórki nowotworowe biorąc czynny udział w projekcie naukowo-badawczym pt. „Najlepsi z najlepszych! 3.0.” projektu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW/2019/8/DIR/NN3(W113)). Na podstawie uzyskanych wyników w 2020 roku obroniła pracę magisterską pt. „Rola nanocząstek złota w odpowiedzi komórek nowotworowych oraz prawidłowych prostaty na promieniowanie jonizujące – model in vitro” pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Wiktorii Suchorskiej oraz prof. dr hab. n. med. Juliana Malickiego. Badania kontynuowała będąc kierownikiem grantu finansowanego przez WCO pt. „Funkcjonalizowane nanocząstki złota jako środek uwrażliwiający komórki nowotworowe piersi oraz komórki prawidłowe nabłonka gruczołu sutkowego na promieniowanie jonizujące – model in vitro.” (5/05/2021/prb/wco/004). Została również beneficjentką Dużego Grantu Badawczego pt. „Rola funkcjonalizacji oraz rozmiaru nanocząstek złota w odpowiedzi komórek nowotworowych piersi na promieniowanie jonizujące – model in vitro 2D i 3D.” (SDUM-GB12/03/21).

Doktorantka uczestniczyła w 8 konferencjach ogólnopolskich oraz 8 konferencjach międzynarodowych. Zdobyła pierwsze miejsce za prezentację ustną w sesji klinicznej podczas konferencji „International Congress of Young Medical Scientists”. Zajęła również pierwsze miejsce za wystąpienie oraz przedstawiony dorobek naukowy podczas pierwszej otwartej sesji sprawozdawczej Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Mgr Musielak jest współautorką 20 artykułów naukowych o łącznym współczynniku wpływu (IF) równym 54,097 i punktacji MNiSW 1.650 punktów. Powyższe publikacje były

cytowane 138 razy (z wyłączeniem autocytowań); wskaźnik Hirscha wynosi 6 (wg. *Web of Science*).

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Mariki Musielak zatytułowana: „Analiza odpowiedzi biologicznej komórek nowotworowych piersi na promieniowanie protonowe z uwzględnieniem mikrośrodowiska guza” jest wartościowym opracowaniem naukowym o istotnych, potencjalnych walorach praktycznych i klinicznych. W zasadniczej części jest samodzielny dziełem Doktorantki. Wpisuje się w nurt dyskusji naukowej na temat radiobiologicznych aspektów radioterapii protonowej w raku piersi z uwzględnieniem roli mikrośrodowiska guza i wybranych czynników molekularnych.

Rozprawa doktorska spełnia ustawowe wymogi sprecyzowane w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku w *sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim.....*

Tym samym wnioskuję do Wysokiej Kapituły Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Mariki Musielak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


KIEROWNIK
Zakładu Radioterapii Katedry Onkologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Prof. dr hab. med. Jacek Fijuth