

Prof. dr hab. n. med. Grzegorz Cieślar
Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych,
Angiologii i Medycyny Fizykalnej w Bytomiu
Wydziału Nauk Medycznych w Zabrze
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

Bytom, dnia 30.12.2021 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Lek. Joanny Gustalik-Nowickiej

pt. „Przydatność diagnostyczna czasów relaksacji metodą rezonansu magnetycznego oraz skuteczność terapii fotodynamicznej w raku piersi”

Aktualnie rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem u kobiet (w roku 2020 w Europie rozpoznano 355 tys. nowych przypadków tego nowotworu), a jednocześnie drugą pod względem częstości występowania przyczyną śmierci u pacjentów onkologicznych. Do czynników ryzyka raka piersi należą m.in.: wiek, rasa, uwarunkowania genetyczne – w tym zwłaszcza mutacje w genach supresorowych guza BRCA1 i BRCA2, cechy i fizjologia piersi, stosowanie preparatów hormonalnych, nadmierne spożywanie alkoholu, nikotynizm, inne uzależnienia oraz niewłaściwa dieta i aktywność fizyczna i są one w dużym stopniu zależne od stopnia rozwoju socjoekonomicznego poszczególnych krajów. Powyższa zależność oraz różny dostęp do nowoczesnych metod diagnostyki i leczenia raka piersi powodują, że w ostatnich latach zachorowalność i śmiertelność w krajach wysoko rozwiniętych stopniowo spada, podczas gdy zachorowalność i śmiertelność w krajach o niskim poziomie ekonomicznym wyraźnie rośnie.

Skala przeżycia pacjentek z rakiem piersi zależna jest zarówno od stadium zaawansowania, jak i podtypu molekularnego tego nowotworu. Dlatego niezwykle istotne jest postawienie możliwie jak najbardziej precyzyjnego rozpoznania na wczesnym etapie rozwoju nowotworu, co znacząco zwiększa szanse pacjentek na dłuższe przeżycie. Uwzględniając fakt relatywnie skąpoobjawowego przebiegu raka piersi we wczesnych fazach jego rozwoju, szczególne znaczenie ma poszukiwanie

nowych, efektywnych metod wczesnej diagnostyki tego nowotworu, wśród których korzystne perspektywy wydaje się mieć obrazowanie metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (MRI) pozwalające na uzyskanie lepszej skuteczności diagnostycznej w zakresie wykrywania i charakteryzowania guzów piersi oraz oceny ich rozległości i potencjalnej odpowiedzi na leczenie, w porównaniu do klasycznych metod, takich jak: samobadanie piersi, usg i mammografia.

Z kolei biorąc pod uwagę fakt, że dotychczas stosowane metody leczenia raka piersi, obejmujące zabieg operacyjny oraz chemiohormonoterapię, które chociaż wykazują dość dużą efektywność terapeutyczną, mają jednak wiele ograniczeń, a także działań niepożądanych, od wielu lat trwają poszukiwania nowych, małoinwazyjnych i pozbawionych istotnych działań ubocznych metod leczniczych, które stosowane w ramach kompleksowej terapii umożliwiałyby leczenie radykalne powierzchownie położonych i mało zaawansowanych postaci raka piersi we wczesnej fazie rozwoju, a także poprawę doszczętności leczenia zabiegowego w przypadku guzów zlokalizowanych w okolicach o utrudnionym dostępie chirurgicznym oraz opornych na chemioterapię.

Na podstawie dostępnych wyników badań przed- i klinicznych duże nadzieje w tym zakresie wiązane są z terapią fotodynamiczną, która jest metodą powodującą selektywne pobudzenie apoptozy w komórkach neoplastycznych spowodowane przekształcaniem tlenu cząsteczkowego w tlen singletowy (będący reaktywną formą tlenu) w wyniku oddziaływania zgromadzonych w dużych ilościach w tkankach guza substancji fotouczulających wzbudzonych światłem o określonej długości fali. Z dostępnej literatury wynika, że efektywność terapeutyczna metody fotodynamicznej w poszczególnych typach nowotworów zależna jest w głównej mierze od właściwego doboru parametrów zabiegowych, co wskazuje na konieczność prowadzenia, przed dokonaniem oceny klinicznej, badań przedklinicznych na modelach tkankowych celem doboru odpowiednich rodzajów fotouczulaczy i optymalnego ich stężenia oraz wartości natężenia i długości fali aplikowanego światła optymalnych dla określonych typów nowotworów.

Uwzględniając powyższe uwagi uważam wybór tematu przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej pt. „Przydatność diagnostyczna czasów relaksacji metodą rezonansu magnetycznego oraz skuteczność terapii fotodynamicznej w raku piersi” za bardzo oryginalny, interesujący i wartościowy, zarówno z poznawczego, jak

i klinicznego punktu widzenia, a rozprawa w mojej ocenie stanowi wypełnienie istotnej luki w dotychczasowej wiedzy z tego zakresu.

Rozprawa ma układ typowy dla tego typu opracowań. Obejmuje ona łącznie 150 stron i po uwzględnionym na początku Wykazie skrótów podzielona została na następujące rozdziały: 1. Wstęp, 2. Aplikacja magnetycznego rezonansu jądrowego w diagnostyce raka piersi, 3. Terapia fotodynamiczna w leczeniu raka piersi, 4. Cel pracy, 5. Metodologia, 6. Wyniki, 7. Dyskusja, 8. Wnioski, 9. Bibliografia, 10. Streszczenie w języku i w języku angielskim oraz 11. Spis tabel i rycin. Do pracy dołączono Uchwałę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim nr 11/11/2018 z dnia 08.11.2018r., w której pozytywnie zaopiniowano projekt badawczy „Ewaluacja diagnostyczna tkanki nowotworowej raka piersi przy zastosowaniu czasów relaksacji MRI *in vivo* i *in vitro* oraz terapii fotodynamicznej *in vitro*”, w ramach którego zrealizowana została rozprawa doktorska oraz 12-stronicowy Załącznik prezentujący zestawienie 7 publikacji, 6 rozdziałów książkowych i 8 abstraktów zjazdowych współautorstwa Doktorantki, których tematyka dotyczy zagadnień omawianych w rozprawie doktorskiej, potwierdzający dobre przygotowanie i duże doświadczenie badawcze Doktorantki w tym zakresie.

W rozprawie wykorzystano 10 tabel i 129 rycin, dobrze dobranych, o znakomitej jakości merytorycznej i technicznej, które w istotny sposób ułatwiają percepcję treści zawartych w tekście rozprawy.

W pierwszych 3 rozdziałach, liczących łącznie 18 stron i stanowiących szeroko rozumiany „Wstęp do rozprawy”, Doktorantka w oparciu o bogate piśmiennictwo światowe przedstawiła w zwięzły, dostatecznie precyzyjny, a jednocześnie przystępny sposób, krótką charakterystykę raka piersi z uwzględnieniem znaczenia wczesnej, precyzyjnej diagnostyki tego nowotworu dla wydłużenia czasu przeżycia pacjentek, historię i podstawy biomedyczne wykorzystania magnetycznego rezonansu jądrowego w diagnostyce nowotworów złośliwych, w tym raka piersi, rys historyczny, zasady działania i przykłady klinicznego zastosowania terapii fotodynamicznej w leczeniu onkologicznym, a także możliwości wykorzystania magnetycznego rezonansu jądrowego w ocenie efektów leczniczych terapii fotodynamicznej w ramach tzw. postępowania teranostycznego.

W rozdziale czwartym „Cele pracy” Doktorantka wyznaczyła sobie następujące cele badawcze:

1. Wykazanie przydatności skanera klinicznego 1,5 T do wykonywania obrazowania ilościowego w tkankach metodą magnetycznego rezonansu jądrowego.
2. Weryfikacja przydatności metody obrazowania z użyciem magnetycznego rezonansu jądrowego do oceny różnic w budowie tkanki zdrowej i zmienionej nowotworowo w wycinkach tkankowych piersi *in vitro*, na podstawie zmiany zawartości wody w obu tych tkankach analizowanej za pomocą pomiaru czasu relaksacji jąder protonu spin-sieć (T_1) i spin-spin (T_2).
3. Ocena zmian występujących w tkankach raka piersi *in vitro* pod wpływem stosowania terapii fotodynamicznej, za pomocą badania histopatologicznego oraz obrazowania metodą magnetycznego rezonansu jądrowego, z uwzględnieniem wpływu różnych wartości stężeń wybranych fotouczulaczy.

Cele rozprawy zostały sformułowane czytelnie, chociaż w mojej ocenie Doktorantka przedstawiła je w nieco chaotycznej formie i przy przygotowywaniu ostatecznej wersji pracy do publikacji wskazane byłoby bardziej uporządkowane opracowanie treści tego rozdziału.

W piątym rozdziale „Metodologia”, liczącym 9 stron, Doktorantka przedstawiła opis grupy badawczej, sposób pobierania i zabezpieczenia wycinków tkankowych z guza piersi oraz czytelną charakterystykę stosowanych metod badawczych (badanie histopatologiczne preparatów tkankowych, pomiar czasów relaksacji metodą magnetycznego rezonansu jądrowego oraz metodyka terapii fotodynamicznej z użyciem czterech wybranych fotouczulaczy w różnych stężeniach i aplikacji promieniowania laserowego o odpowiednich długościach fali), uzupełnioną o reprezentatywny materiał ilustracyjny oraz opis zastosowanych metod analizy statystycznej uzyskanych wyników.

W wersji pracy przygotowywanej do publikacji w pierwszym akapicie tego rozdziału proponuję uwzględnić informację, że próbki tkankowe raka piersi zostały uzyskane z materiału pooperacyjnego, a nie np. z biopsatów, czego w obecnej wersji rozprawy można się jedynie domyślać.

Wykorzystane w pracy metody badawcze są adekwatne do założonych celów badawczych, nowoczesne oraz wiarygodne, a użyte metody statystyczne zostały dobrane właściwie do charakteru uzyskanych wyników pomiarowych.

W najobszerniejszym szóstym rozdziale „Wyniki”, liczącym 75 stron, Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki badań przy użyciu licznych, dobrze dobranych, czytelnie opisanych oraz reprezentatywnych tabel i rycin o bardzo dobrej

jakości technicznej. Biorąc pod uwagę fakt, że analiza statystyczna obejmowała weryfikację wartości różnych parametrów pomiarowych pomiędzy kilkoma grupami badanych próbek, przyjęty przez Doktorantkę sposób prezentacji uzyskanych znamienności statystycznych w formie osobnych tabel, a nie bezpośrednio na wykresach, sprzyja większej czytelności przedstawionych wyników. Jako cenny element pracy należy w mojej ocenie uznać umieszczenie w tabelach i na rycinach wyników pomiarów czasów relaksacji dokonanych dla poszczególnych próbek, co umożliwia weryfikację przeprowadzonej analizy statystycznej uzyskanych wyników.

Pierwsze pięć akapitów tego rozdziału stanowi w zasadzie uzupełnienie opisu metodyki badania magnetycznego rezonansu jądrowego i w ostatecznej wersji pracy przygotowywanej do druku w mojej ocenie należy je umieścić w rozdziale 5 „Metodologia”

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wykazała, że dane ilościowe czasów relaksacji jąder protonu spin-sieć (T_1) i spin-spin (T_2), uzyskane metodą magnetycznego rezonansu jądrowego na skanerze klinicznym o wysokim polu widzenia przy indukcji pola 1,5 T są wiarygodne, dokładne i porównywalne z danymi uzyskanymi za pomocą dedykowanych systemów o małej średnicy, pracujących przy wyższej natężeniu indukcji pola magnetycznego, przy uwzględnieniu ograniczeń tego typu skanera w zakresie siły gradientu i elastyczności oprogramowania. Ponadto potwierdziła, że pomiary czasów relaksacji T_1 i T_2 metodą magnetycznego rezonansu jądrowego precyzyjnie odzwierciedlają zmiany w składzie tkanek zdrowych i zmienionych nowotworowo we fragmentach tkankowych ludzkiego raka piersi w modelu *in vitro* zależne od zawartości wody w tych tkankach, w tym także zmiany wywołane działaniem terapii fotodynamicznej. Udowodniła również, że terapia fotodynamiczna wykazuje skuteczność terapeutyczną w przypadku fragmentów tkankowych ludzkiego raka piersi poddanych jej oddziaływaniu w modelu *in vitro*, przy czym uzyskane efekty weryfikowane za pomocą badania histopatologicznego i oceny czasów relaksacji metodą magnetycznego rezonansu jądrowego zależne były od rodzaju zastosowanego fotouczulacza i jego stężenia. Najmniejsze różnice (nieznamienne statystycznie) wartości czasów relaksacji pomiędzy tkanką zmienioną nowotworowo przed- i po zastosowaniu terapii fotodynamicznej dotyczyły czasu relaksacji T_2 w przypadku użycia jako fotouczulacza dichlorku ftalocyjaniny krzemu oraz soli disodowej protoporfiryny IX.

W kolejnym siódmym rozdziale „Dyskusja”, liczącym 13 stron, Doktorantka przedstawiła interpretację uzyskanych wyników w oparciu o liczne dane literaturowe, przy czym w mojej ocenie szczególnie wartościowe informacje zawarła w podrozdziale „Innowacyjne narzędzie informatyczne do diagnostyki i leczenia raka piersi analizujące dane Magnetycznego Rezonansu Jądrowego”, w którym wyczerpujący i zrozumiały również dla czytelnika nie posiadającego wykształcenia technicznego sposób, opisała mechanizmy fizyczne i biologiczne uzasadniające możliwość wykorzystania magnetycznego rezonansu jądrowego do oceny struktury tkanek m.in. w eksperymentach „*in vitro*” - pewien niedosyt powoduje fakt, że nie wykorzystwała w tym celu źródeł referencyjnych, co prawdopodobnie wynika z pionierskiego charakteru tego zakresu tematyki rozprawy. Sądzę, że w ostatecznej wersji pracy przygotowywanej do publikacji warto byłoby dokonać ponownego wnikliwego przeglądu literatury w tym aspekcie.

Uzyskane przekonujące wyniki o wysokim poziomie znamienności statystycznej w pełni uzasadniają przedstawione przez Doktorantkę w rozdziale ósmym wnioski, które zasadniczo odpowiadają postawionym celom rozprawy.

W ostatecznej wersji pracy przygotowywanej do publikacji proponuję zrezygnować z opisowej formy prezentacji wniosków i przedstawić poszczególne wnioski w punktach, co znacznie poprawi ich czytelność. Ponadto pierwsze dwa akapity tego rozdziału stanowią formę podsumowania wyników, a ilustrująca je tabela jest powtórzeniem tabeli 6.9 umieszczonej wcześniej w rozdziale „Wyniki” na stronie 110 - proponuję usunąć ten fragment rozdziału w ostatecznej wersji pracy przygotowywanej do publikacji.

Dołączone do rozprawy streszczenia w języku polskim i angielskim w sposób zrozumiały prezentują najistotniejsze elementy treści rozprawy, przy czym warto byłoby uwzględnić w nich krótki akapit przedstawiający wnioski wynikające z przeprowadzonych badań. Ponadto w 3 zdaniu pierwszego akapitu obu streszczeń wskazane byłoby podkreślenie, że ocena reakcji komórek ludzkiego raka piersi na terapię fotodynamiczną prowadzona była na modelu *in vitro*.

Piśmiennictwo pracy obejmuje 169 pozycji, dobrze dobranych i właściwie cytowanych w tekście, w tym aż 167 artykułów angielskojęzycznych opublikowanych w zdecydowanej większości w liczących się czasopismach o wysokim wskaźniku oddziaływania oraz 1 rozdział w monografii anglojęzycznej i 1 Zalecenia w formie linku internetowego. Wykorzystane piśmiennictwo jest bardzo aktualne, gdyż blisko

70% pozycji opublikowanych zostało w ciągu ostatnich 10 lat. Spis publikacji opracowany został starannie, jednak w przygotowywanej do druku wersji pracy wskazane jest dokonanie drobnych korekt i uzupełnień w celu ujednolicenia stylu prezentacji poszczególnych pozycji piśmiennictwa. Przykładowo w pozycjach 1, 4, 5, 27, 33, 36, 41, 42, 48, 50, 51, 54, 65, 69, 82, 85, 91, 92, 93, 101, 105, 106, 108, 111, 132, 148, 159 i 164 poszczególne słowa w tytułach publikacji rozpoczynają się dużą literą, podczas gdy w pozostałych pozycjach piśmiennictwa wszystkie słowa pisane są małymi literami. Z kolei w pozycjach 10, 11 i 98 brakuje niektórych danych bibliograficznych, a ostateczna wersja opisu tych pozycji w spisie piśmiennictwa powinna wyglądać następująco:

10. American College of Radiology. ACR practice parameter for the performance of contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI) of the breast. American College of Radiology; 2014. <https://www.acr.org/Clinical-Resources/Practice-Parameters-and-Technical-Standards> dostęp xx.xx.2021.

11. Hayden M, Nacher P. History and physical principles of MRI. In Saba L. (ed.). Magnetic Resonance Imaging Handbook, Vol. 1, CRC press, 2016.

98. Galan LA, Hamon N, Nguyen C, Molnár E, Kiss J, Mendy J, Hadj-Kaddour K, Onofre M, Trencsényi G, Monnereau C, Beyler M, Tircsó G, Gary-Bobo M, Maury O, Tripiet R. Design of Polyazamacrocyclic Gd³⁺ Theranostic Agent Combining MRI and Two-Photon PDT. Inorg Chem Front. 2021, 8, 2213-24.

Ponadto w opisie niektórych pozycji piśmiennictwa użyto niewłaściwej formy lub całkowicie pominięto skracanie numeracji ostatniej strony artykułów.

Praca napisana jest dobrą polszczyzną, chociaż Doktorantka nie ustrzegła się uchybień stylistycznych, które w niektórych fragmentach rozprawy nieco utrudniają zrozumienie treści i wymagają poprawy w ostatecznej wersji pracy przygotowywanej do publikacji.

Przedstawione powyżej drobne uwagi, mające głównie charakter edytorski, nie pomniejszają wysoce pozytywnej oceny merytorycznej rozprawy, stanowiącej oryginalne osiągnięcie badawcze Doktorantki, która właściwie zaplanowała i przeprowadziła interesujący eksperyment o charakterze badania przedklinicznego na modelu tkankowym *in vitro*, którego wyniki mają istotne znaczenie poznawcze oraz potencjalnie także kliniczne w zakresie możliwości wykorzystania pomiaru wybranych parametrów badania rezonansu magnetycznego w diagnostyce raka

piersi oraz zastosowania terapii fotodynamicznej z użyciem wybranych fotouczulaczy w leczeniu tego nowotworu.

Na podkreślenie zasługuje również znaczny nakład pracy Doktorantki, wynikający z przeprowadzenia bardzo dużej liczby pomiarów parametrów fizycznych badania rezonansu magnetycznego oraz analizy wpływu licznych parametrów fizycznych terapii fotodynamicznej na uzyskany efekt letalny w tkankach ludzkiego raka piersi. W mojej ocenie każdy z 2 problemów badawczych analizowanych w rozprawie mógłby stanowić sam w sobie wartościowy i wystarczający materiał do przygotowania rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, jestem przekonany, że recenzowana rozprawa pt. „Przydatność diagnostyczna czasów relaksacji metodą rezonansu magnetycznego oraz skuteczność terapii fotodynamicznej w raku piersi” spełnia wymogi stawiane kandydatom na stopień naukowy doktora określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i w związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego z wnioskiem o dopuszczenie lek. Joanny Gustalik-Nowickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Oddziału Klinicznego
Chorób Wewnętrznych
Angiologii i Medycyny Fizykajnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
prof. dr hab. n. med. Grzegorz Cieślak