



Prof. dr hab. inż. Paweł Chmielarz
Kierownik Katedry Chemii Fizycznej
e-mail: p_chmiel@prz.edu.pl

Rzeszów, 13.08.2022 r.

Recenzja

pracy doktorskiej Pani lek. Elżbiety Ostańskiej
pt. „Ocena skuteczności chemioterapii raka piersi z zastosowaniem czasów relaksacji
rezonansu magnetycznego i metody fotodynamicznej”

Niniejsza recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo prof. dr hab. n. med. Artura Mazura, Prorektora ds. Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego, nr CM/5200/O-99/22 z dnia 11 lipca 2022 roku informujące o tym, że Rada Naukowa Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego powołała mnie na recenzenta w tym postępowaniu. Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi ponadto umowa z Uniwersytetem Rzeszowskim nr GU/2022/06/00702 z dnia 30 czerwca 2022 roku.

Recenzję oparto na przekazanych mi materiałach, czyli zawartości pracy doktorskiej obejmującej głównie opracowanie Doktorantki wraz z załączonymi 3 publikacjami oraz oświadczeniami ich współautorów i zgodą bioetyczną.

Informacje dotyczące pracy doktorskiej i dorobku naukowego

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została zrealizowana w Zakładzie Biochemii i Chemii Ogólnej Instytutu Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego pod kierunkiem dr hab. n. med. inż. Doroty Bartusik-Aebisher,





prof. UR. Podstawową część rozprawy obejmuje monotematyczny cykl artykułów naukowych stanowiących osiągnięcie naukowe, wymienionych na początku dysertacji i opatrzonych wspólnym tytułem. Wykaz ten uzupełnia ok. 7 stron wprowadzenia w tematykę badawczą (możliwości zastosowania czasów relaksacji rezonansu magnetycznego i metody fotodynamicznej do oceny skuteczności chemioterapii raka piersi), łącznie 16 stron merytorycznego opisu problematyki poruszanej w publikacjach wraz z podsumowaniem i wnioskami, a także krótkie streszczenie pracy w języku polskim i angielskim.

W autoreferacie zawarty jest również wykaz osiągnięć naukowych Doktorantki w tym zestawienie udziału w konferencjach oraz odbytych stażach naukowych i szkoleniach, wykaz rozdziałów w monografiach, a także zestawienie danych bibliometrycznych obejmujących wartość wskaźnika *Impact Factor* (IF) kolejnych publikacji. Na uwagę zasługuje będący na bardzo dobrym poziomie sumaryczny dorobek naukowy Doktorantki, który składa się z 3 rozdziałów w zagranicznym wydawnictwie monograficznym (*Nova Science Publishers*), 3 opublikowanych własnych prac oryginalnych i pracy przeglądowej ujętych w bazie *Journal Citation Reports* (JCR) o sumarycznej wartości 5-letniego *Impact Factor* (IF_{5Y}) równej 14,1. Listę dorobku zamyka spis 14 publikacji nie ujętych w bazie JCR oraz 6 udziałów w konferencjach bez wystąpień, 10 wystąpień konferencyjnych w formie 5 komunikatów ustnych i 5 prezentacji posterowych, których współautorem była Doktorantka. Podkreślenia wymaga także fakt odbycia przez Doktorantkę dwóch staży, a mianowicie długoterminowego stażu krajowego w Katedrze Patomorfologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (01.1996–01.2015) oraz krótkoterminowego stażu zagranicznego w Brest Unit Department of Histopathology City Hospital Nottingham w Wielkiej Brytanii (05–06.2017).

Dalej w rozprawie zamieszczone są kopie 3 publikacji stanowiących rozprawę doktorską, a na jej końcu deklaracje współautorów publikacji dotyczące udziału w ich powstanie. Na podstawie zamieszczonych opisów możliwe jest jednoznaczne stwierdzenie jaki jest wkład Doktorantki w powstanie wymienionych prac.





Praca doktorska – wymogi formalne

Praca doktorska lek. Elżbiety Ostańskiej obejmuje 3 artykuły naukowe uzupełnione autorskim opracowaniem. Artykuły naukowe były opublikowane w czasopismach zagranicznych o zróżnicowanym współczynniku oddziaływania: przeciętnym (*Acta Poloniae Pharmaceutica* – $IF_{5Y} = 0,645$), dobrym (*Medicina* – $IF_{5Y} = 2,985$) i bardzo dobrym (*Biomedicine and Pharmacotherapy* – $IF_{5Y} = 6,581$). Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF_{5Y}) wymienionych czasopism, w których zostały opublikowane prace wynosi 10,2 (według Web of Science), przy czym średnia wartość IF_{5Y} monotematycznych publikacji wynosi 3,4. Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej były cytowane 25 razy (bez autocytowań) według Web of Science, przy czym indeks Hirscha lek. Elżbiety Ostańskiej wynosi 2 (stan na dzień 13.08.2022).

Z analizy zapisów zawartych w deklaracjach współautorów publikacji wynika, że wkład Doktorantki wraz z Promotorem w powstanie 3 publikacji był wiodący i polegał na opracowaniu koncepcji badań, ich przeprowadzeniu wraz z analizą oraz opracowaniem uzyskanych wyników w formie publikacji sfinalizowanych zredagowaniem manuskryptów, co jest istotne przy ocenie wpływu pracy Doktorantki na rozwój dyscypliny naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Udział pozostałych autorów polegał najczęściej na przeprowadzeniu określonych eksperymentów oraz współudziale w opracowaniu wyników.

Wszystkie te wskaźniki świadczą o dobrym poziomie prezentowanych prac naukowych stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki o zdrowiu oraz są potwierdzeniem ważności prowadzonych badań, zarówno pod względem naukowym, jak i praktycznym. Po analizie tych materiałów nie mam wątpliwości, że wszystkie wymogi ustawowe i zwyczajowe przyjęte przez krajowe placówki akademickie dla tej formy prezentacji rozprawy doktorskiej zostały spełnione.





Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Moją ocenę pracy doktorskiej Pani lek. Elżbiety Ostańskiej zamierzam przedstawić w trzech zasadniczych punktach:

1. Aktualność tematyki badawczej, w tym oryginalność rozwiązania problemu badawczego.
2. Zakres pracy i fachowość Doktorantki w doborze i interpretacji metod badawczych, w tym ogólna wiedza teoretyczna Kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.
3. Sposób zredagowania rozprawy.

Ad. 1. Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy w istocie analizy skuteczności chemioterapii raka piersi przy wykorzystaniu klinicznego rezonansu magnetycznego (MRI) oraz metody fotodynamicznej (PDT). Autorka rozprawy uważa, iż aby stosowana forma leczenia była efektywna i skuteczna na całym etapie leczenia należy ją nieustannie monitorować. Jedną z metod kontroli zastosowanej formy leczenia może być ocena parametrów fizyko-chemicznych tkanki zdrowej i nowotworowej w oparciu o ocenę czasów relaksacji wody za pomocą wspomnianego rezonansu magnetycznego. Inną alternatywną technikę stanowić może metoda fotodynamiczna stosowana do oszacowania różnic pomiędzy tkanką nowotworową i zdrową, a także różnic pomiędzy tkanką nowotworową przed chemioterapią i po chemioterapii. W tym przypadku różnice są spowodowane inną zdolnością produkcji tlenu singletowego w tkankach (o czym pisze Doktorantka w pracy przeglądowej [nr 1] opublikowanej w czasopiśmie *Biomedicine and Pharmacotherapy*).

Wybór metodyki badań dokonany przez Doktorantkę należy uznać za jak najbardziej aktualny, ponieważ metoda fotodynamiczna oraz ocena parametrów fizykochemicznych w MRI stanowią techniki alternatywne lub uzupełniające w leczeniu i diagnostyce raka piersi w stosunku do diagnostyki obrazowej i patomorfologicznej. Terapia fotodynamiczna stanowi obiecujące rozwiązanie





w leczeniu raka piersi, ponieważ może być bardzo skuteczna przy jednoczesnym zachowaniu prawidłowej struktury tkanki. Umieszczenie guza często wymaga zastosowania wysoce precyzyjnej technologii w celu usunięcia go, gdy jest zlokalizowany poblizu ważnych miejsc anatomicznych. Miejsca, które są często niedostępne lub niebezpieczne do leczenia tradycyjnymi metodami chirurgicznymi i medycznymi, obejmują główne naczynia krwionośne, takie jak tętnice szyjne, krytyczne obszary mózgu czy oka. W ciągu ostatnich dwóch dekad terapia PDT stała się ważną metodą leczenia nowotworów, takich jak nowotwory skóry i przełyku. PDT wykorzystuje podanie dożylnie fotouczulaczy przy jednoczesnym zastosowaniu źródła światła o dobrze zdefiniowanej i odpowiedniej długości fali, celem generowania tlenu singletowego 1O_2 . Powstały w ten sposób produkt reakcji inicjuje proces prowadzący do śmierci komórek rakowych i guza. Co więcej, w trakcie realizacji pracy doktorskiej Doktorantka użyła metody PDT z zastosowaniem światłowodowego generatora tlenu singletowego, który może być używany jako precyzyjny fotochemiczny nóż chirurgiczny do niszczenia komórek nowotworowych w obszarach wymagających kontroli cytotoksycznej i w obszarach niedostępnych dla metod chirurgicznych. W tych badaniach niemal od samego początku uczestniczą pod kierownictwem dr hab. n. med. inż. Doroty Bartusik-Aebisher, prof. UR, pracownicy Zakładu Biochemii i Chemii Ogólnej Instytutu Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego. Obecnie jest to jeden z głównych ośrodków naukowych w Polsce rozwijających tą tematykę badawczą.

Reasumując, uważam, że podjęcie pracy w tak nowatorskiej dziedzinie wiedzy, jaką jest analiza skuteczności chemioterapii raka piersi przy wykorzystaniu rezonansu magnetycznego oraz metody fotodynamicznej spełnia kryteria, jakim powinna odpowiadać współczesna praca doktorska. W tym miejscu należy podkreślić, iż oceniana dysertacja wpisuje się w trend nieustannych prac badawczych podejmowanych w wielu światowych ośrodkach, w tym także w zespole rzeszowskim m. in. nad terapią fotodynamiczną, którą zwykle stosuje się w dermatologii w leczeniu raka skóry i zmian przedrakowych oraz raka głowy i szyi. W tym kontekście połączenie PDT i chemioterapii, czyli chemioterapii fotodynamicznej, może zwiększać podatność komórek nowotworowych na





chemioterapeutyki, zapewniając tym samym lepszy synergiczny efekt przeciwnowotworowy.

Ad. 2. Zakres prac badawczych, jakie wykonała Doktorantka i opisała w swojej rozprawie, spełnia zwyczajowe wymagania stawiane wobec kandydatów do stopnia naukowego doktora. Lek. Elżbieta Ostańska zaprojektowała szereg eksperymentów, które polegały na pobieraniu w czasie zabiegu operacyjnego próbek tkankowych raka piersi, analizowanych następnie przy użyciu techniki MRI oraz metody PDT (publikacja [nr 2] w czasopiśmie *Medicina* i publikacja [nr 3] w czasopiśmie *Acta Poloniae Pharmaceutica*). W następnych etapach badań gruntownie przeanalizowała uzyskane wyniki pomiarów fizykochemicznych tkanek, które zostały porównane z obrazami histopatologicznymi materiału pooperacyjnego. Dodatkowo, tkanki nowotworowe poddano terapii fotodynamicznej wykorzystując róż bengalski w celu redukcji komórek nowotworowych raka piersi analizując skuteczność terapii PDT w badaniu *in vitro* (co scharakteryzowane w pracach [nr 2] i [nr 3]).

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka stwierdziła, iż tkanka zdrowa oraz tkanka nowotworowa po chemioterapii w oparciu o różnicę zawartości wody posiadają różne czasy relaksacji w badaniu MRI. W tej części rozprawy wykazała także, że ich ekwiwalentem są obserwowane zmiany histopatologiczne tkanek nowotworowych po chemioterapii i poddanych terapii fotodynamicznej, które są zależne od produkcji toksycznych rodników tlenowych. Ważnym aspektem prowadzonych prac było potwierdzenie, iż zaaplikowana terapia PDT na tkanki nowotworowe wywołała uszkodzenie błon cytoplazmatycznych skutkując uszkodzeniem lizosomów i mitochondriów. W dalszej części pracy Autorka wykazała, że tkanki leczone chemioterapią oraz PDT charakteryzowały się dalej posuniętymi zmianami degradacyjnymi tkanki nowotworowej.

W tej części rozprawy Doktorantka wykazała, moim zdaniem, dużą sprawność w prowadzeniu prac eksperymentalnych i interpretacji uzyskiwanych wyników, które potwierdziły, iż za pomocą klinicznego rezonansu magnetycznego analizując czasy relaksacji możliwe jest zróżnicowanie tkanek leczonych i nieleczonych.





Ważnym aspektem prowadzonych prac było również potwierdzenie skuteczności terapii PDT tkanek nowotworowych w warunkach *in vitro*.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam także uwagi krytyczne, które są oczywiście dyskusyjne. Jeżeli przyjąć, że praca miała częściowo charakter badań podstawowych i lek. Elżbieta Ostańska podjęła się analizy m. in. działania różu bengalskiego jako fotouczulacza w reakcji fotodynamicznej celem redukcji komórek nowotworowych raka piersi analizując tym samym skuteczność metody PDT w przygotowanym przez siebie układzie – wtedy uznałbym, że Autorka nie wykorzystwała możliwości bardziej gruntownego zbadania mechanizmu reakcji, wraz z wyznaczeniem przykładowo pozornych stałych szybkości reakcji składowych i oceny wpływu poszczególnych parametrów na ich przebieg. Ograniczyła się jedynie do potwierdzenia/stwierdzenia, iż w zastosowanych w pracy warunkach reakcja fotodynamiczna, która opiera się na kooperacji trzech czynników: światła, tlenu i fotouczulacza zachodzi z powodzeniem zgodnie z jednym z dwóch mechanizmów zależnych od stężenia tlenu, a prowadzących do powstania reaktywnych form tlenu działających cytotoksycznie na tkankę guza (prace [nr 2] i [nr 3]).

Doktorantka w pracy przeglądowej [nr 1] stwierdza, iż obecnie jest kilka zatwierdzonych fotouczulaczy dopuszczonych do terapii PDT, natomiast w swoich pracach koncentruje się wyłącznie na zastosowaniu nowego rozwiązania w postaci różu bengalskiego (prace [nr 2] i [nr 3]), który teoretycznie ma szansę zastosowania w klinicznym leczeniu raka piersi. Niemniej jednak w przyszłości znaczącą rolę odegrają fotouczulacze nowej generacji w postaci nanoplatform (o czym pisze Doktorantka w pracy przeglądowej [nr 1]) złożonych z nanonośników organicznych np. liposomów, miceli lub nieorganicznych jak tlenki metali, polimerów, z chemioterapeutycznym oraz ze związkami światłoczułym. Cząsteczki te umożliwiają diagnozowanie procesów chorobowych, a jednocześnie pełnią rolę terapeutyczną. Połączenie nanomateriałów z fotouczulaczami i możliwość sterowania wielkością uzyskanych cząstek, zwiększa skuteczność terapii oraz niweluje jej skutki uboczne. Przyszłością jest niewątpliwie konstrukcja nanoplatform, w których poszczególne składowe stanowią nanonośniki w postaci nanocząstek krzemu modyfikowanych





łańcuchami polimerowymi, chemioterapeutyk, substancje wiążące się z receptorami raka oraz fotouczulacz (o czym również pisze Doktorantka w pracy przeglądowej [nr 1] oraz w pracy [nr 3]). Wybór różu bengalskiego jako fotouczulacza jest jak najbardziej słuszny, jednak biorąc pod uwagę zalety stosowania nanomateriałów modyfikowanych łańcuchami polimerowymi do rozwiązań lek. Elżbiety Ostańskiej pozostawiam możliwość przeprowadzenia dodatkowych eksperymentów, z wykorzystaniem wspomnianych nanoplateform. Do tego celu najlepszym rozwiązaniem jest wybór jednej z metod polimeryzacji rodnikowej z odwracalną dezaktywacją (RDRP, ang. Reversible-Deactivation Radical Polymerization), które oferują możliwość sterowania architekturą makrocząsteczek, a tym samym otwierają pole do poszukiwań materiałów polimerowych o unikalnych właściwościach. Co więcej, nanocząstki krzemu szczepione precyzyjnie zdefiniowanymi łańcuchami polimerowymi oferują możliwość ich dalszej modyfikacji w wyniku procesu wprowadzania grup funkcyjnych, których obecność może być wykorzystywana do dalszej polimeryzacji i konstruowania bardziej skomplikowanych i dobrze zdefiniowanych struktur polimerowych z wykorzystaniem wybranych metod RDRP.

Wymienione uwagi dyskusyjne nie mają wpływu na moją ocenę całości pracy. Podsumowując stwierdzam, iż Kandydatka posiada dużą widzę teoretyczną z zakresu analizy skuteczności chemioterapii raka piersi przy wykorzystaniu rezonansu magnetycznego oraz metody fotodynamicznej, a także posiada bardzo dobre przygotowanie do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i rozwiązywania istotnych problemów praktycznych.

Ad 3. Przedstawiona do oceny praca doktorska została zredagowana starannie, znalazłem jedynie bardzo nieliczne uchybienia językowe i interpunkcyjne. Układ pracy, jak już wspomniałem, jest typowy dla rozpraw doktorskich.

Niemniej jednak w związku z ocenianą dysertacją nasuwają mi się następujące uwagi i pytania do Doktorantki:

- Moja uwaga krytyczna dotyczy treści i układu części literaturowej (rozdział 1. Wstęp i uzasadnienie tematu oraz rozdział 3. Wyjaśnienie problemu badawczego). Autorka koncentruje się wyłącznie na omówieniu





zasady działania fotouczulaczy w terapii PDT, pomijając ich konkretne przykłady wraz ze wskazaniem perspektywicznych kierunków rozwoju. W rozdziale 4. Opis publikacji nr 1 wraz ze skanem pracy (praca przeglądowa [nr 1]) omawia jedynie główne odmiany fotouczulaczy nowej generacji, czyli takie których rdzeń może przekształcać energię uzyskaną z fotonów (PUNP, ang. Photon Upconverting Nanoparticles) oraz transformujące nanocząstki funkcjonalizowane (UCNP, ang. Upconverting nanoparticles). Uważam, że Doktorantka powinna przynajmniej wymienić także metody syntezy nowej generacji fotouczulaczy, takie jak wspomniane już wcześniej techniki RDRP, chociażby dla wykazania się dobrym rozeznaniem w tej dość jeszcze hermetycznej dziedzinie wiedzy.

- Kilkakrotnie z autoreferacie używane pojęcie „stanu tripletowego” lepiej byłoby zastąpić sformułowaniem „stanu trypletowego”.
- W pracy doktorskiej wskazanych zostało wiele potencjalnych kierunków zastosowań różu bengalskiego jako fotouczulacza w terapii PDT, które z nich Doktorantka uważa za potencjalnie najbardziej aplikacyjne obiecujące?

Wszystkie te dostrzeżone przeze mnie drobne błędy i niedopatrzania, a także moje uwagi dyskusyjne nie mają wpływu na moją ocenę całości pracy. Uważam, iż ich wyeliminowanie lub ewentualne wyjaśnienie może być przydatne w przygotowaniu kolejnych artykułów naukowych obejmujących obszar tematyczny pracy doktorskiej.

Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że opiniowany monotematyczny cykl publikacji stanowiący wraz z autoreferatem dysertację doktorską lek. Elżbiety Ostańskiej zawiera szereg elementów nowości naukowej i stanowi istotny wkład w rozwój dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Uważam, że recenzowana praca doktorska stanowi opis zwartego osiągnięcia naukowego a zatem spełnia wymogi



formalne, zawarte w obowiązujących przepisach ustawowych. W publikacjach opisane zostały nowe i warte kontynuacji kierunki badań. Należy podkreślić, że lek. Elżbieta Ostańska w pełni zrealizowała założone cele pracy, wykonała przy tym bardzo szeroki zakres badań stosując i modyfikując nowoczesne techniki badawcze. Nie mam także wątpliwości, że zaplanowanie eksperymentów, ich realizacja, jak i forma przedstawienia wyników wraz z ich wszechstronną analizą, świadczą o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki oraz wskazują na bardzo dobre przygotowanie do samodzielnego prowadzenia badań naukowych czy rozwiązywania kluczowych problemów praktycznych.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa spełnia warunki określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity w Dz.U. 2017 poz. 1789) oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19.01.2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018, poz.261) zatem formuję wniosek do Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego o przyjęcie pracy doktorskiej i dopuszczenie Pani lek. Elżbiety Ostańskiej do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Dodatkowo mając na uwadze szeroki zakres wykonanych badań, wagę otrzymanych wyników scharakteryzowanych w cyklu artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych o łącznym współczynniku $IF_{5y} > 10$, a także ich przedstawienie podczas szeregu konferencji wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej zgodnie z kryteriami wyróżniania prac doktorskich w Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego.

Paweł Chmielarz

Prof. dr hab. inż. Paweł Chmielarz

