

Prof. dr hab. n. med. Aleksandra Kawczyk-Krupka
Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych,
Angiologii, Medycyny Fizykalnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Batorego 15, 41-902 Bytom
tel/fax: +48 32 7861630

Bytom, 30.11.2021r

**Recenzja pracy doktorskiej na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych
i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk o zdrowiu**

mgr inż. Łukasza Ożoga

**pod tytułem: „OCENA PRZYDATNOŚCI NIEKONWENCJONALNYCH METOD
GENEROWANIA I WYKRYWANIA $^1\text{O}_2$ W DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska lekarza Łukasza Ożoga oparta została na cyklu prac i wykonana pod opieką promotora Pana dr hab. n. med. Davida Aebishera, Profesora Uniwersytetu Rzeszowskiego, Kolegium Nauk Medycznych.

Tematem pracy doktorskiej mgr inż. Łukasza Ożoga jest ocena przydatności niekonwencjonalnych metod generowania i wykrywania $^1\text{O}_2$ w diagnostyce medycznej. Przedstawiona rozprawa doktorska omawia monotematyczny materiał, który obejmuje wyniki badań opublikowanych w trzech oryginalnych publikacjach na temat metod wykrywania konsumowanego podczas terapii fotodynamicznej tlenu oraz wykorzystaniem ich w diagnostyce medycznej, a także dwóch publikacjach poglądowych na temat wykorzystania terapii fotodynamicznej (PDT) oraz nowych metod generowania i wykrywania tlenu singletowego. Cykl publikacji ma charakter innowacyjny w zakresie eksperymentalnej terapii fotodynamicznej.

Rozprawa doktorska mgr inż. Łukasza Ożoga została przygotowana w oparciu o wyniki własnych badań, których rezultatem są następujące artykuły rozprawy doktorskiej:

1. Bartusik-Aebisher Dorota, Ożóg Łukasz, Aebisher David. Alternative methods of photodynamic therapy and oxygen consumption measurements: A review. Biomedicine and Pharmacotherapy. - 2021, Vol. 134, id. art. 111095 (IF: 6.529, MEiN: 100 pkt)
2. Domka Wojciech Krzysztof, Ożóg Łukasz, Bartusik-Aebisher Dorota, Aebisher David. Fluorescence diagnostics and photodynamic therapy in cancer. Acta Poloniae Pharmaceutica.

Drug Research. - 2020, Vol. 77, no. 4, s. 517-540 (IF: 0.330, MEiN: 70 pkt)

3. Ożóg Łukasz, Domka Wojciech Krzysztof, Truszkiewicz Adrian, Tabarkiewicz Jacek, Aebisher David. Monitoring photodynamic oxygen consumption by endogenous oxygen contrast MRI. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. - 2019, vol. 25, p. 492-498 (IF: 2.894, MEiN: 70 pkt)

4. Ożóg Łukasz, Domka Wojciech Krzysztof, Bartusik-Aebisher Dorota, Aebisher David. Larynx tumor tissue response to photodynamic therapy with Rose Bengal. Acta Poloniae Pharmaceutica. Drug Research. - 2020, Vol. 77, no. 4, s. 581-586 (IF: 0.330, MEiN: 70 pkt)

5. Bartusik-Aebisher Dorota, Ożóg Łukasz, Domka Wojciech Krzysztof, Aebisher David. Rose Bengal and future directions in larynx tumor photodynamic therapy. Photochemistry and Photobiology. - 2021, doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111095 (IF: 3.421, MEiN: 70 pkt)

Podstawę postępowania doktorskiego stanowi cykl prac składający się z dwóch artykułów przeglądowych (1–2) oraz trzech pełnotekstowych, oryginalnych artykułów naukowych (3–5) opublikowanych w czasopismach wydawanych w znaczących wydawnictwach naukowych, takich jak: Elsevier, Wiley-Blackwell, Polish Pharmaceutical Society. W trzech oryginalnych pracach, wchodzących w cykl prac, został wykorzystany materiał biologiczny w postaci wycinków tkanek krtani oraz tarczycy pobranych od pacjentów Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 1 im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie. Badania z użyciem tkanek ludzkich zostały zatwierdzone na mocy Uchwały Nr143/B/2018 Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie z dnia 22 listopada 2018r.

Autor przedstawił rozprawę w następujących rozdziałach:

1. Punktacja publikacji naukowych stanowiących cykl
2. Publikacje składające się na cykl prac stanowiących rozprawę doktorską
3. Omówienie prac włączonych do cyklu publikacji
4. Wyniki prac naukowych w trakcie otwartego przewodu doktorskiego 2019-2021
5. Podsumowanie
6. Lista publikacji 2017-2021 (nie wchodzących w skład rozprawy doktorskiej)
7. Rozdziały w monografiach
8. Wykaz konferencji
9. Streszczenie rozprawy doktorskiej
10. Streszczenie rozprawy doktorskiej w języku angielskim
11. Załączniki

Artykuł zatytułowany „Alternative methods of photodynamic therapy and oxygen consumption measurements: A review” stanowi przegląd badań nad niekonwencjonalnymi metodami pomiaru zużycia tlenu w trakcie terapii fotodynamicznej. W pierwszej części pracy opisana została terapia fotodynamiczna oraz mechanizm powstawania reaktywnych form tlenu. Kolejne fragmenty pracy zawierają opis zjawisk takich jak luminescencja, bioluminescencja,



chemiluminescencja oraz zjawiska nadkonwersji jako alternatywnych metod generowania $^1\text{O}_2$ do zastosowań biologicznych in vivo oraz zastosowania klinicznego rezonansu magnetycznego do pomiaru konsumpcji tlenu.

Druga praca pogładowa wchodząca w cykl prac Doktoranta pt. „Fluorescence diagnostics and photodynamic therapy in cancer” poświęcona jest terapii oraz diagnostyce przy wykorzystaniu światła fluorescencji.

Trzecia publikacja, w której Doktorant jest pierwszym autorem, pt. „Monitoring photodynamic oxygen consumption by endogenous oxygen contrast MRI”, opublikowana w *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* - 2019, vol. 25, p. 492-498 (IF:2.894, MEiN: 70 pkt), stanowi pracę oryginalną.

Autor wykonał badania na wycinkach tkanek nowotworowych oraz zdrowych krtani i języka. Badanie zostało przeprowadzone w celu oceny wykonalności monitorowania fotokonsumpcji tlenu przy użyciu samego tlenu rozpuszczonego jako endogennego środka kontrastowego MRI przed i po akcji fotodynamicznej in vitro, wykorzystując rezonans magnetyczny i laser półprzewodnikowy MGL-III-532 nm/300 mW, wodoszczelny miernik tlenu Elmetron CPR-411 oraz mikroskop Leica DM1000 LED wyposażony w kamerę cyfrową Leica DMC2900. Doktorant mierzył fotodynamiczne zużycie tlenu za pomocą klinicznego skanera rezonansu magnetycznego o mocy 1,5T, wykorzystując zmiany czasu relaksacji spin-sieć w roztworach wodnych. Czasy relaksacji T1 były mierzone w zamkniętych probówkach zawierających wodę nasyconą powietrzem, tlenem i argonem. Pomiar odbywał się po systematycznym ekspozowaniu próbek na działanie powietrza atmosferycznego. W przeprowadzonym badaniu Doktorant potwierdził, że kliniczny skaner rezonansu magnetycznego umożliwia precyzyjny pomiar zawartości tlenu, poprzez wyznaczenie czasów relaksacji T1.

W następnym etapie badania Autor dokonał pomiaru czasu T1 wycinków zdrowej oraz nowotworowej tkanki krtani i tkanki tarczycy, u których zastosowano PDT, a na podstawie uzyskanych wyników Autor wykazał, że dalszy wzrost czasu T1 na skutek naświetlania nie został zaobserwowany, ze względu na wyczerpanie tlenu w wyniku akcji fotodynamicznej.

W kolejnej pracy oryginalnej, w której Doktorant jest pierwszym autorem, pt. „Larynx tumor tissue response to photodynamic therapy with Rose Bengal”, opublikowanej w *Acta Poloniae Pharmaceutica. Drug Research*. - 2020, Vol. 77, no. 4, s. 581-586 (IF: 0.330, MEiN: 70 pkt)

Doktorant wykazał, że terapia fotodynamiczna z zastosowaniem fotouczulacza (PS)- różu bengalskiego (Rose Bengal) normalnych oraz nowotworowych tkanek krtani spowodowało, iż tlen zawarty w ich strukturze został zużytkowany w trakcie akcji fotodynamicznej, co z kolei zostało zarejestrowane w postaci wydłużenia czasu T2, a analiza obrazów histologicznych wykazała, że zastosowany w badaniu czas naświetlania pozwolił na uzyskanie efektu terapeutycznego widocznego na obrazach mikroskopowych.

W ostatniej, z cyklu oryginalnej pracy, w której Doktorant jest drugim autorem, pt. „Rose Bengal and future directions in larynx tumor photodynamic therapy”, opublikowanej w Photochemistry and Photobiology- 2021, doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111095 (IF: 3.421, MEiN: 70 pkt), Doktorant obrał cel, którym było sprawdzenie głębokości penetracji fotouczulacza w strukturę tkanki krtani na przykładzie tkanki prawidłowej i nowotworowej in vitro. Przeprowadzenie analizy obrazów histologicznych posłużyło Doktorantowi do określenia głębokości penetracji PS oraz oceny efektów wywołanych podczas PDT.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów Doktorant wykazał, że pomimo odpowiedniego dostarczania źródła światła i wystarczającej głębokości penetracji tkanki przez wiązkę lasera, efekt PDT był widoczny tylko na zewnętrznych warstwach tkanki krtani (zarówno w tkance prawidłowej, jak i nowotworowej), co wyraźnie wskazuje na znaczenie bezpośredniego celowanego dostarczania fotouczulacza do tkanki w celu uzyskania najlepszego efektu terapeutycznego.

Podsumowując zasadnicze badania Doktoranta, materiał biologiczny stanowiły wycinki tkanek pobranych od 30 pacjentów z nowotworami głowy i szyi Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 1 im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie. Badania z użyciem tkanek ludzkich zostały zatwierdzone na mocy Uchwały Nr 143/B/2018 Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Rzeszowie z dnia 22 listopada 2018 roku. Badania przeprowadzono na świeżo wyciętych próbkach normalnej i nowotworowej tkanki krtani tarczycy w łącznej liczbie 30 próbek zdrowej tkanki kontrolnej i 30 próbek tkanki nowotworowej.

Doktorant zastosował fotouczulacz w postaci Różu Bengalskiego, laser półprzewodnikowy MGL-III-532 nm/300 mW (CNI Lasers, Chiny) o długości fali 532 nm oraz źródło światła z zakresu widzialnego w postaci lampy halogenowej o mocy 400W, a czas naświetlania wynosił od 15 do 40 min. Przeprowadzono badania, których celem było osiągnięcie efektu letalnego komórek nowotworowych, za pomocą fotouczulacza, tlenu i światła laserowego. Doktorant dokonał pomiaru penetracji fotouczulacza tkanki krtani in vitro oraz analizy związanej z oceną

zastosowania PDT w przypadku tego typu nowotworu. Przy współpracy z Kliniką Patomorfologii wykonane zostały badania histopatologiczne tkanek użytych w eksperymencie. Analizy obrazów histologicznych wykonano przy użyciu mikroskopu LED Leica DM1000 (LEICA Microsystems, Wetzlar, Niemcy). Doktorant uzyskał niezwykle ciekawe wyniki- badanie histologiczne tkanek nowotworowych wykazało uszkodzenie jąder komórek nowotworowych krtani i tarczycy w wyniku PDT, po dostarczeniu fotouczulacza bezpośrednio do tkanki. Obrazy histologiczne wykazały widoczny nabłonek nowotworu z obrazem piknozy komórkowej. Analiza mikroskopowa pokazała również, że po dostarczeniu fotouczulacza na powierzchnie tkanki i przeprowadzeniu naświetlania, na głębokości większej niż 2 mm nie doszło do zabarwienia tkanki przez RB oraz, że komórki na tej głębokości nie zostały w żaden sposób uszkodzone. Zmierzone czasy T1 oraz T2 wykazały skuteczność w ocenie konsumpcji tlenu w trakcie akcji fotodynamicznej poprzez ich wydłużenie. Zastosowane metody badawcze umożliwiły Autorowi pracę ocenę skuteczności działania terapii poprzez możliwość oceny czasu naświetlania potrzebnego do skonsumowania tlenu obecnego w strukturze tkanek. Sekwencja mapowania T2 umożliwiła scharakteryzowanie tkanek krtani i rozróżnienie tkanki nowotworowej od tkanki normalnej. Efekt w postaci uszkodzenia komórek po zastosowaniu PDT zarejestrowano tylko w tych warstwach tkanki, w których fotouczulacz bezpośrednio oddziaływał z jej strukturą. A nasuwający się wniosek z przeprowadzonych badań jest taki, że ukierunkowane dostarczanie fotouczulacza, bezpośrednio do tkanki umożliwiłoby uzyskanie najlepszego efektu terapeutycznego.

Przedstawione przez Doktoranta badanie wykazało, że PDT jest skutecznym zarówno w leczeniu pierwszoplanowym, jak też jako alternatywny sposób leczenia raka krtani i tarczycy. Fotogenerowany tlen singletowy będący głównym czynnikiem odpowiedzialnym za martwicę komórek podczas fotodynamicznej terapii raka doprowadził do uszkodzenia komórek rakowych, co potwierdziła analiza histopatologiczna. Do realizacji badań Autor wykorzystał techniki oparte na obrazowaniu rezonansem magnetycznym oraz techniki laserowe i spektrometryczne. Przytoczone prace cechuje interdyscyplinarny charakter badań z uwagi na konieczność podjęcia współpracy ze specjalistami z różnych dziedzin.

Przeprowadzone przez Doktoranta niezwykle żmudne i interesujące badania wykazały potencjał terapii fotodynamicznej i rezonansu magnetycznego do rozwiązania problemu leczenia, gdy guz występuje w miejscach chirurgicznie złożonych, na przykład gdy guzy są bezpośrednio sąsiadujące z narządami takimi jak krtani czy tarczyca, co ma niezwykle istotne znaczenie kliniczne przy ewentualnych próbach leczenia pacjentów z rakami krtani i tarczycy. Bezpośredni pomiar czasu relaksacji T1 oraz mapowanie T2 za pomocą MRI umożliwiło



monitorowanie konsumpcji tlenu na skutek akcji fotodynamicznej oraz pozwoliło na zróżnicowanie tkanki normalnej od nowotworowej. Przeprowadzone badania umożliwiły określenie granic stosowania PDT w strukturze tkanek oraz wykazały się przydatnym narzędziem diagnostycznym.

Całość pracy doktorskiej mgr. inż. Łukasza Ożoga oceniam bardzo wysoko. Doktorant przedstawił ciekawe wyniki badań w oparciu o dobrze dobrany model eksperymentalny z wykorzystaniem wysokiej klasy aparatury naukowo-badawczej. Autor pracy dowiódł tym samym, że potrafi przeprowadzić wzorowo eksperyment naukowy a następnie opracować uzyskane wyniki badań i w sposób przejrzysty przedstawić je czytelnikowi.

Z obowiązku recenzenta rozprawy doktorskiej muszę jednakże zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia zauważone przeze mnie w trakcie lektury manuskryptu. Poniżej wymieniam nieścisłości Autora, a z konieczności i w związku z rolą recenzenta- własne uwagi krytyczne, które jednak absolutnie nie umniejszają wysokiej oceny, którą wystawiam Doktorantowi:

1. Cel pracy, materiał i metody, wyniki przeprowadzonych eksperymentów, dyskusja nie budzą zastrzeżeń w publikacjach, zwłaszcza, że zostały opublikowane w renomowanych czasopismach i uzyskały pozytywne recenzje. Warto jednak byłoby, aby Doktorant, wprowadzając czytelnika w cykl prac stanowiących jego Rozprawę Doktorską, czyli autorską formę monografii, przedstawił na wstępie w postaci krótkiej dysertacji cele, wyniki, wnioski, zanim przejdzie do dokładnego opisu powyższych publikacji.
2. W rozprawie zabrakło typowego podziału na akapity, które zebrałyby w całość wszystkie eksperymenty i nadały im logiczną i spójną formę. Sprecyzowany jasno cel prac, metody, wnioski, stanowiące odpowiedź na obrane cele, niewątpliwie wzbogaciłyby Rozprawę, i pozwoliły uzmysłwić, zobrazować i w pełni docenić ogromny trud Doktoranta na każdym etapie prowadzenia badań, docenić Jego pomysłowość, samodzielność, innowacyjność i oryginalność, o których to cechach dowiadujemy się z żmudnie napisanych publikacji. Jest to niezbędna forma w Rozprawie Doktorskiej, w której Autor może, już poza publikacjami, przekazać wiele informacji, wysunąć hipotezy i formułować wnioski, których nie zawsze można rozwinąć w lapidarnej formie naukowej publikacji. Wyodrębnienie powyższych składowych Rozprawy i taki plan przekazu nadałby o wiele bardziej pasjonującą formę powyższej Rozprawie, bo tak trzeba traktować otrzymane przez Doktoranta wyniki badań.



3. W pracy pojawiają się drobne błędy stylistyczne, interpunkcyjne, gramatyczne i edytorskie
4. Autor pisze dysertację raz w formie bezosobowej, natomiast innym razem pojawiają się również zdania w formie czynnej, więc proponuję ujednolicenie wypowiedzi.

Warte podkreślenia są wartości naukowe i poznawcze powyższej dysertacji, do których zaliczam:

1. Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność oraz ciągłość logicznego wyводу w poszczególnych publikacjach,
2. Poprawność w sformułowaniu założeń badawczych.
3. Duże znaczenie uzyskanych rezultatów dla nauki i praktyki, w tym możliwości ich bezpośredniego przełożenia na badania kliniczne i bezpośrednie zastosowanie praktyczne,
4. Generalnie poprawność formalno-językową, stylistyczną i interpunkcyjną- Doktorant posługuje się poprawnym słownictwem, charakterystycznym dla prac naukowych, medyczny język angielski jest prawidłowy,
5. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętności ich zastosowania - Doktorant przedstawia w załączonych pracach dokładny opis całej procedury badawczej oraz oznaczeń poszczególnych etapów eksperymentu. Przedstawiona charakterystyka wymienionych metod nie budzi zastrzeżeń.
6. Doskonałą oprawę edytorską publikacji – wyraźne, o dużej rozdzielczości i kolorowe zdjęcia obrazów mikroskopowych tkanek
7. Właściwy dobór literatury i umiejętności wykorzystania źródeł bibliograficznych
8. Nowatorski i aktualny w aspekcie chorób cywilizacyjnych, a taki mają raki głowy i szyi, charakter badań, którym jest rozszerzenie wskazań do zastosowania terapii fotodynamicznej oraz możliwość zwiększenia jej skuteczności zarówno jako metody z wyboru w leczeniu pierwszoplanowym, jak też w leczeniu adiuwantowym, bądź paliatywnym
9. Rozwojowy charakter pracy- Doktorant wielokrotnie na podstawie analizy uzyskanych wyników zadaje pytania i inspirowanie do rozszerzenia eksperymentów, wyznacza kolejne etapy badań, aby dokładniej zgłębić cel i odpowiedzieć na kolejne kwestie i pytania pojawiające się i ewoluujące podczas przeprowadzanych eksperymentów.



Wniosek końcowy

Szczegółowa i wnikliwa ocena osiągnięć naukowo-badawczych mgr. inż. Łukasza Ożoga upoważnia mnie do wyrażenia wysoce pozytywnej opinii. Dojrzałość naukowa Doktoranta poparta jest zdolnością do analitycznego myślenia i trafnego wyciągania wniosków. Rozprawa doktorska udowadnia, że mgr. inż. Łukasz Ożóg jest dojrzałym pracownikiem naukowym, w pełni zdolnym do realizowania samodzielnych, twórczych koncepcji naukowych zasługujących na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

Na podstawie wymienionych przeze mnie wysokich aspektów naukowych i poznawczych powyższej dysertacji uważam, że rozprawa doktorska mgr. inż. Łukasza Ożoga spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami).

W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Uniwersytetu Rzeszowskiego Kolegium Nauk Medycznych o kontynuowanie postępowania o nadanie mgr. inż. Łukaszowi Ożóg stopnia doktora nauk o zdrowiu. Jednocześnie składam wniosek o jej wyróżnienie, z uwagi na wysoką wartość naukową i istotny wkład uzyskanych wyników w rozwój nauk medycznych i nauk o zdrowiu.



PROFESOR BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Oddziału Klinicznego
Chorób Wewnętrznych, Angiologii
i Medycyny Fizykalnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. Aleksandra Kawczyk-Krupka

Bytom, 30.11.2021r.

Aleksandra Kawczyk-Krupka