

Prof.dr hab.n.med Andrzej. Wiczowski
Katedra Mikrobiologii i Immunologii
Wydział Lekarski
WST w Katowicach

Piekary Śląskie 12.04.2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Adriana Truszkiewicza pt. "Spektroskopia i czasy relaksacji magnetycznego rezonansu jądrowego *in vitro* jako narzędzie do charakterystyki nowotworów na poziomie komórkowym" wykonanej pod kierunkiem dr hab.n.med.inż.Doroty Bartusik-Aebisher, prof.UR.

Strona formalna rozprawy:

Rozprawa doktorska mgr Adriana Truszkiewicza jest zbiorem 10 monotematycznych publikacji opisujących zastosowanie metody rezonansu jądrowego do wykrywania komórek nowotworowych. Oryginalnym rozwiązaniem było zastosowanie do badania próbek z komórkami nowotworowymi aparatu do badań klinicznych metodą rezonansu jądrowego o polu 1,5 Tesla.

Przedstawiona do recenzji praca zawiera : spis treści, wykaz skrótów, uzasadnienie wyboru tematu, notę informacyjną, która jest spisem 10 publikacji, cel eksperymentu z tezami badawczymi, opis metodologii eksperymentu, wyniki badań i dyskusję. Następnie zamieszczono skany poszczególnych artykułów poprzedzone krótkimi opisami. Pracę kończy podsumowanie, wnioski i streszczenia w języku polskim i angielskim. Do rozprawy dołączono oświadczenia współautorów publikacji, decyzję komisji bioetycznej i spis bogatego dorobku naukowego i zawodowego Doktoranta.

Artykuły, które są przedmiotem rozprawy zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach, dwa z nich w czasopiśmie o punktacji 140 punktów MEN i 6, 208 IF, kolejne dwa w czasopismach o punktacji 100 punktów MEN i 20 punktów MEN. Pozostałych 6 to artykuły zamieszczone w czasopiśmie Inżynier i Fizyk Medyczny o punktacji 5 punktów MEN. We wszystkich artykułach Doktorant jest pierwszym autorem, a kolejnym jest promotor rozprawy doktorskiej.

Uważam, że w wyżej wymienionym zakresie przekazana do recenzji rozprawa spełnia formalne wymagania pracy doktorskiej.

W tym miejscu chciałbym wyraźnie zaznaczyć , że ze względu na zakres mojej wiedzy, zainteresowań naukowych i zawodowych nie będę się wypowiadał na temat rozwiązań technicznych i informatycznych, sądzę, że w tych tematach wypowiadali się recenzenci publikacji.

Ocena strony merytorycznej pracy:

W celu i założeniach rozprawy Autor stwierdza, że technika magnetycznego rezonansu jądrowego jest obecnie jedną z najdokładniejszych i nieinwazyjnych metod obrazowania z szerokim zastosowaniem w diagnostyce klinicznej. W związku z powyższym podjął próbę zastosowania do badania hodowli komórek, w tym nowotworowych, aparatu przewidzianego do diagnostyki obrazowej o polu 1,5 Tesla. Przedmiotem analizy były próbki pobrane z hodowli fibroblastów, komórek raka jajnika, płuc i nerki, umieszczone w probówkach typu „eppendorf”. Już wstępne badania wykazały, że konieczne są zmiany w konstrukcji aparatu przystosowujące warunki pomiaru do wielkości i kształtu próbek. Stało się to podstawą do przyjęcia następujących szczegółowych celów pracy:

- po pierwsze wdrożenia metod hodowli zakupionych w American Type Culture Collection komórek nowotworów jajnika, płuc i nerki,
- zbadanie próbek hodowli metodą rezonansu jądrowego i spektroskopii rezonansu magnetycznego za pomocą aparatu Optima MR360 firmy GE Healthcare o polu 1.5 Tesla i analiza czynników wpływających na wyniki pomiaru,
- optymalizacja warunków pomiaru i opracowanie odpowiednich aplikacji metody numerycznej i zaimplementowanie jej w pakiecie MATLAB.

W rozdziale Metodologia eksperymentu i w artykule 1 i 2 znajdują się dokładne opisy hodowli zakupionych klonów komórkowych. Hodowle prowadzone były w bioreaktorach z zastosowaniem odpowiednich dla każdego rodzaju komórek podłoży przez okres 4 tygodni aż do uzyskania odpowiedniej gęstości komórek. Do badań używano próbek zawierających 100 000 komórek zliczanych na cytometrze i umieszczanych w probówkach typu „eppendorf”. W aparacie do MRJ oceniano czasy relaksacji próbek uzyskując istotne różnice charakterystyczne dla każdego rodzaju komórek. W pracy nr 1 sporządzono wzorzec dla zbadania różnic w zawartości składników podłoży hodowlanych z roztworów siarczanu miedzi. Natomiast w pracy nr 2 wzorcem dla zbadania rozdzielczości obrazów rejestrowanych przez aparat była probówka z kapilarami plastikowymi. Badania opisane w artykule 1 i 2 wykazały przydatność metody MRJ i aparatu OPTIMA 36MRJ GE Healthcare do wykrywania i obrazowania zawiesin komórek, w tym także komórek nowotworowych.

Metodą rezonansu magnetycznego można wykrywać i oceniać stężenia związków chemicznych, w tym także produktów metabolizmu komórkowego. Doktorant wykorzystując technikę spektroskopii w MRJ przeprowadził badania nad obecnością i zawartością kwasu mlekowego jako wykładnika aktywności metabolicznej komórek. Przeprowadzony eksperyment wykazał przydatność metody i aparatu do przeprowadzania takich badań *in vivo*. Wyniki tych badań i konieczne modyfikacje w budowie aparatu przedstawił w artykule 3. Kolejny artykuł nr 4 dotyczy zastosowania sieci neuronowej do optymalizacji czasu trwania obliczeń potrzebnych do wytworzenia kolorowych map wartości czasu relaksacji T1 i T2. Jak podaje Autor w omówieniu, wynikiem działania zaproponowanej w artykule sieci neuronowej jest usunięcie z obliczeń pikseli obszarów takich jak przestrzenie upowietrzone lub artefakty sugerujące istnienie w obrazie długich czasów T1.

Prace o numerach 5,6,7,8 i 9 opublikowano w czasopiśmie Inżynier i Fizyk Medyczny . W artykule nr 5 przeanalizowano sposób określania czasu relaksacji podłużnej T1 i szczegóły techniczne wpływające na jakość pomiaru. W artykule nr 6 analizowany jest wpływ szumu i natężenia sygnału rejestrowanego przez cewkę nadawczo-odbiorczą na wartość czasu T1. W artykule 7 w eksperymencie z blokiem żelaznym z żelatyny badano czynniki zakłócające pomiar czasu relaksacji wynikające z niejednorodności struktury badanych próbek biologicznych.

W artykule 8 Autorzy opisują zastosowanie skonstruowanych przez nich układów odbiorczych dostosowanych do badania próbek pobranych z hodowli komórkowych. W tym artykule podkreślają fakt, że za zastosowaniem MRJ o polu 1,5 Tesla przemawia prawdopodobieństwo minimalnego wpływu pola magnetycznego na żywe komórki. W artykule 9 zastosowano metodę spektroskopowego MRJ w analizie mediów do hodowli poszczególnych rodzajów komórek. Wyniki skanowania wykazały różnice w składzie podłoża, a zastosowany w pracy fantom w postaci probówek zawierających podłoża hodowlane i 2 kapilary wypełnione alkoholem ułatwił ocenę zróżnicowania gęstości składników i wykrycia szumów i artefaktów. Ostatni artykuł to podsumowanie wcześniej opublikowanych danych. Celem tej pracy było ocenienie przydatności średniopolowych systemów rezonansu magnetycznego do obrazowania hodowli komórkowych. Po wprowadzeniu opisanych w poprzednich pracach zmian w cewkach, w metodyce badań i technikach obliczeniowych Autorzy piszą, że z całą pewnością mogą stwierdzić, że system OPTIMA 360MR prod. GE Healthcare wraz z opracowanym obwodem odbiorczym pozwala na obrazowanie hodowli komórkowych.

Po zakończeniu prezentacji artykułów Autor w Podsumowaniu skupia się na stronie technicznej przeprowadzonych badań. Punktuje wyniki związane z opracowaniem oprogramowania, weryfikacją algorytmu obliczeniowego, skonstruowaniem zestawu cewek, zastosowaniem sztucznych sieci neuronowych i techniki spektroskopii.

Kończąc przedstawioną w skrócie analizę 10 publikacji mogę stwierdzić, że Doktorant zrealizował zadania postawione w celu eksperymentu i tezach badawczych. Opracował i wdrożył metody hodowli komórek, przeprowadził obrazowanie hodowli komórkowych i przeanalizował udział czynników zakłócających przebiegi pomiaru oraz podjął liczne działania dla optymalizacji warunków pomiaru. Znajduje to swój wyraz w Dyskusji i 7 wnioskach sformułowanych na zakończenie pracy. Trzy pierwsze są opisem wykonanych badań, następne cztery są właściwymi wnioskami wynikającymi z przeprowadzonych eksperymentów. Nie znajduję w nich jednak pełnego odniesienia do celów pracy, a przede wszystkim do wyników badań z zawiesinami komórek. Najważniejszym jest wniosek 7 w którym Autor potwierdza przydatność zastosowanej aparatury do badania hodowli komórkowych.

Uwagi recenzenta dotyczą części rozprawy napisanej przez Doktoranta a nie zamieszczonych w pracy artykułów :

1. Uważam, że w Celu eksperymentu poza głównym sformułowaniem dotyczącym monitoringu hodowli komórkowych powinna się znaleźć ta część badań o której mowa w Podsumowaniu na str 131,
2. W Metodologii eksperymentu na str11 zdanie „ W celu obrazowania bioreaktor podłączony do butelki zbiorczej jest umieszczany w komorze kompatybilnej zMR z ciągłym przepływem powietrza vi CO2 gdy znajduje się on w magnecie” o co chodzi, proszę o wytłumaczenie,
3. Sądzę, że zrozumienie metod hodowli i postępowania z komórkami ułatwiłoby zamieszczenie kilku zdjęć lub schematów
4. Uważam, że w pisać Metodologię eksperymentu byłoby korzystniej gdyby Autor odnosił się w niej do poszczególnych artykułów zaznaczając ich numer.

Ocena pracy:

Rozprawa doktorska mgr Adriana Truskiewicza jest logicznie powiązany cykl prac odpowiadających na pytanie czy aparat do średniopoleowego rezonansu magnetycznego przewidzianego do badań obrazowych na ludziach można przystosować do badania niewielkich próbek hodowli komórek umieszczonych w probówkach typu "eppendorf". Autor jasno sformułował cele pracy i w kolejnych publikacjach je zrealizował. W realizacji poszczególnych zadań posługiwał się współczesną techniką badawczą, wykazał się dużą znajomością technik obliczeniowych i zastosowaniem sieci neuronowej do analizy wyników badań. Wykazał się także umiejętnościami technicznymi konstruując odpowiednie cewki dostosowane do rozmiarów badanych próbek. Wykorzystane w pracy artykuły połączył w całość odpowiednim wprowadzeniem, skróconym opisem metod badawczych, wyników i dyskusją. Każdy artykuł poprzedził krótkim streszczeniem, może nieraz zbyt ogólnikowym, na zakończenie podsumował wyniki prac i przedstawił 7 wniosków i założenia do dalszych badań poprawiających jakość obrazowania i zakres oznaczania biomarkerów komórek nowotworowych.

Dokonana wyżej ocena jest podstawą do stwierdzenia, że rozprawa doktorska mgr Adriana Truskiewicza pt. "Spektroskopia i czasy relaksacji magnetycznego rezonansu jądrowego *in vitro* jako narzędzie do charakterystyki nowotworów na poziomie komórkowym" spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz.1789)" i upoważnia mnie do wystąpienia do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr Adriana Truskiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra Mikrobiologii i Immunologii

Andrzej Wiczkowski
prof. dr hab. n. med. Andrzej Wiczkowski
Kierownik Katedry