

OCENA ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

LEKARZA OLIVERA BUDNERA PT.:

„OCENA PRZYDATNOŚCI KLINICZNEJ FLUORESCENCJI BŁEKITU

METYLENOWEGO W BIOPSIJ WĘZŁA WARTOWNICZEGO W RAKU PIERSI”.

(„Clinical evaluation of methylene blue dye in sentinel node biopsy in breast cancer”)

Nowotwory złośliwe gruczołu piersiowego stanowią istotny z epidemiologicznego punktu widzenia problem zdrowotny. Jak wynika ze statystyk, mimo utrzymującego się trendu coraz większej liczby zachorowań wśród kobiet na te nowotwory liczba zgonów z tego powodu pozostaje na względnie stałym poziomie od lat. Stan ten jest wynikiem po części, coraz powszechniejszej wczesnej diagnostyki raka piersi, a co za tym idzie większych szans na przeżycie oraz coraz skuteczniejszych metod leczenia kobiet z tym nowotworem. To ostatnie, czyli postęp w zakresie metod terapeutycznych nie byłby możliwy, gdyby nie coraz lepsze zrozumienie biologii raka piersi oraz anatomii gruczołu piersiowego i jego układu chłonnego. W okresie ostatnich 50-ciu lat zasadniczy przełom, który można określić kamieniami milowymi w nowoczesnym podejściu do leczenia kobiet z rakiem piersi stanowiły: w zakresie podejścia systemowego – wprowadzenie molekularnej klasyfikacji raka piersi, natomiast w zakresie leczenia chirurgicznego – wdrożenie jako standardu koncepcji węzła wartowniczego.

Badania anatomiczne, jak i obserwacje kliniczne, wskazują, że przerzuty nowotworu zajmują w pierwszej kolejności regionalne dla danego narządu stacje węzłów chłonnych. Poszukując bezpośrednich na to dowodów Cabanas w latach 60-tych XX wieku przeprowadził serię doświadczeń z wykorzystaniem limfangiografii jako metody przyżyciowego obrazowania układu chłonnego. Wykonywał on identyfikację naczyń chłonnych piętą, a następnie po ich kaniulizacji wstrzykiwał materiał kontrastowy. W każdym przypadku środek ten gromadził się w podkolanowych węzłach chłonnych. Obserwacje sugerujące istnienie węzła wartowniczego początkowo nie wywołały powszechniejszego zainteresowania w postaci kontynuacji badań klinicznych. Identyfikacja naczyń chłonnych i ich preparowanie celem podania materiału znakującego metodą zaproponowaną przez Cabanasa była techniką trudną i skomplikowaną do zastosowania w codziennej praktyce.

Dopiero Morton na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych przeprowadził pierwsze badania kliniczne nad znaczeniem węzła wartowniczego w czerniaku skóry zlokalizowanym na kończynach. Wykorzystał on, co podkreśla Doktorant w streszczeniu swojej dysertacji znacznie prostszą technikę. Zastosował znacznik koloidowy, który wstrzykiwał podskórnym wokół zmiany. Znacznik ten łatwo przedostawał się do naczyń chłonnych, a następnie do węzłów chłonnych. Tą metodą udało się uzyskać wybarwienie pojedynczych węzłów chłonnych u 194 na 237 pacjentów z czerniakiem skóry. Węzeł ten lub grupa 2-3 węzłów chłonnych (w niektórych przypadkach), odzwierciedlały prawidłowo histologiczny status pozostałych węzłów chłonnych w 99%. Wyniki badań Mortona i wsp. zwróciły powszechną uwagę na koncepcję węzła wartowniczego i jego potencjalną rolę w ocenie regionalnych węzłów chłonnych. W 1993 roku, kilka miesięcy po opublikowaniu wyników pracy Mortona, Alex i Krag zaproponowali zastosowanie jako znacznika koloidu znakowanego radioaktywnie. Miejsce gromadzenia się koloidu oznaczane było za pomocą przedoperacyjnej limfoscintygrafii oraz śródoperacyjnie, z wykorzystaniem ręcznego detektora do wykrywania promieniowania gamma. Następnie Krag i współpracownicy przeprowadzili pilotażowe badanie wśród 22 pacjentek z rakiem piersi, u których podali koloid siarczkowy znakowany technetem (Tc^{99}). Węzeł wartowniczy został zidentyfikowany tą metodą u 18 pacjentek. W 7 przypadkach zawierał on przerzuty nowotworowe. Zgodność histologiczna węzła wartowniczego ze stanem pozostałych węzłów pachowych wyniosła 100%. Dalej sprawy potoczyły się niemal lawinowo. W 2000 roku, w Filadelfii podczas Konsensusu dotyczącego roli i znaczenia węzła wartowniczego w raku piersi po raz pierwszy zaproponowano wprowadzenie tej metody jako standardu leczenia w przypadku klinicznie wolnych od przerzutów węzłów chłonnych pachowych. Przyjęto jednocześnie, że znakowanie powinno odbywać się podwójną metodą, czyli z zastosowaniem znacznika barwnego i znacznika radioaktywnego. W kolejnych latach metoda ta jedynie ugruntowała swoją wartość jako efektywna, a przede wszystkim onkologicznie bezpieczna. Natomiast, dyskusje i badania zaczęły się koncentrować wokół najbardziej optymalnych i prostych do zastosowania metod znakowania węzła wartowniczego oraz znaczenia i roli obecności przerzutów w tych węzłach w aspekcie dalszego postępowania klinicznego.

Znaczniki oparte o identyfikację sondy radioaktywnej mają tę niezaprzeczalną zaletę, że ich identyfikacja jest możliwa niezależnie od głębokości penetracji tkanek oraz w zasadzie czasu, kiedy chcemy tej identyfikacji dokonać. Wynika to z wielkości

cząsteczki nośnika oraz czasu połowicznego rozpadu zastosowanego pierwiastka radioaktywnego. Podstawowa jednak wadą tej techniki jest konieczność dostępu do pracowni medycyny nuklearnej oraz narażenie na, niewielkie co prawda, lecz jednak stałe dawki promieniowania. Stąd, potrzeba poszukiwania innych technik znakowania węzła wartowniczego, które byłyby z jednej strony skuteczne, a z drugiej proste i bezpieczne. Metoda identyfikacji wzrokowej wykorzystuje znaczniki barwne, takie jak: błękit metylenowy, błękit siarczkowy (isosulfan blue) czy opatentowany preparat o nazwie „Patent Blue V”. Różnice wśród nich dotyczą przede wszystkim wielkości cząsteczki, co powoduje krótsze bądź dłuższe zatrzymywanie ich w układzie siateczkowo - śródbłonkowym węzła chłonnego. Największą cząsteczkę posiada preparat Patent Blau V, najmniejszą błękit metylenowy. Stąd, identyfikacja wzrokowa węzła wartowniczego przy pomocy tego ostatniego preparatu wymaga największej wprawy chirurgicznej. W ostatnich jednak latach okazał się, że błękit metylenowy cechuje się również właściwościami fluorescencyjnymi i może być wykorzystany jako fluorofor możliwy do identyfikacji w bliskiej podczerwieni. Czyli może być zastosowany, podobnie jak zieleń indocyjaninowa (ICG) w chirurgii naprowadzanej obrazem (IGS).

Te, ostatnio odkryte właściwości błękitu metylenowego stał się przedmiotem badań Doktoranta w jednej z prac stanowiących niniejszą dysertację.

Na rozprawę doktorską lekarza Olivera Budnera składają się dwie publikacje:

1. *Methylene Blue near-Infrared Fluorescence Imaging in Breast cancer Sentinel Node Biopsy.*

Budner O, Cwaliński T, Skokowski J, Marano L, Resca L, Cwalina N,
Kalinowski L, Hoveling R, Roviello F, Polom K
Cancers (Basel) 2022 Apr 3: 1817; IF: 6,575; MEiN: 140

2. *Trends and future perspective in sentinel node biopsy in breast cancer patients.*

Budner O, Polom K.
Farmacja Współczesna 2022; 15:151-156; IF: 0; MEiN: 20

Celem pierwszej z wymienionych, oryginalnej pracy było wykazanie właściwości fluorescencyjnych błękitu metylenowego w wykrywaniu węzłów wartowniczych u

chorych na raka piersi. Dodatkowym celem było określenie, jak różne rozcieńczenia błękitu metylenowego mogą poprawić jego właściwości fluorescencyjne.

Badaniem objęto 49 pacjentek ze zweryfikowanym rakiem piersi i klinicznie negatywnymi węzłami chłonnymi. W identyfikacji węzła wartowniczego zastosowano, oprócz błękitu metylenowego nanokoloid znakowany technetem, który stanowił referencyjne odniesienie do wyników znakowania barwnikiem. Identyfikację wizualną w postaci niebieskiego wybarwienia węzła chłonnego (wartowniczego) stwierdzono u 40 pacjentek (81,6%); natomiast chirurgia naprowadzana obrazem (IGS) skuteczna była u 23 chorych (46,9%). Przy czym, ostatecznie fluorescencja w węzle chłonnym widoczna była w przypadku 25 chorych (51%). U wszystkich pacjentek w badanej grupie udało się zlokalizować węzeł wartowniczy przy pomocy nanokoloidu znakowanego technetem. Czynniki mającymi istotnie statystyczny wpływ na powodzenie identyfikacji węzła wartowniczego w technice z zastosowaniem błękitu metylenowego były: palenie tytoniu oraz chemioterapia neoadjuwantowa dla wizualizacji fluorescencji, natomiast dla wizualizacji wzrokowej niebieskiego wybarwienia jedynie chemioterapia neoadjuwantowa. Drugim elementem analizy były wartości rozcieńczenia błękitu metylenowego, które charakteryzowały by się najlepszą intensywnością fluorescencji. Tutaj wykazano, że wartość 40 μM (0,0128 mg/ml) jest optymalna w tym celu. Wnioski, jakie Doktorant wysnuł z wyników swojej pracy odnoszą się bezpośrednio do uzyskanej czułości identyfikacji węzła wartowniczego z zastosowaniem błękitu metylenowego. Uważa on, iż związek ten cechuje się potencjałem w zastosowaniu w tym wskazaniu, jednak standardowe rozcieńczenia powinny być zweryfikowane i zmodyfikowane, aby ta skuteczność metody była akceptowalna i porównywalna z innymi technikami czy znacznikami.

Druga praca to przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat znaczenia obecności przerzutów węzłach wartowniczych w kwalifikacji do dalszego leczenia ewentualnie celem określenia rokowania u tych chorych. Autorzy tej publikacji (w której Doktorant jest również pierwszym autorem) w sposób bardzo precyzyjny, systematyczny, a zarazem zwięzły dokonują analizy wybranych pozycji literaturowych oraz triali będących w trakcie realizacji, by skonstatować, że wielu sytuacjach klinicznych pozytywny status węzła wartowniczego (zajęcia go przez przerzuty nowotworowe) pozwala już na odstępnie od systemowej limfadenektomii pachowej. W pracy tej przedstawiono również, opierając się na wynikach badania SENTINA oraz ACOSOG

Z1071 aktualną wiedzę i stanowisko w kwestii identyfikacji węzła wartowniczego u chorych po chemioterapii neoadjuwantowej.

Podsumowując, obie prace powstały jako efekt ciekawości badawczej Doktoranta eksplorując (w przypadku pierwszej z nich) możliwości uznanej metody diagnostycznej przy pomocy nowych narzędzi. Zarówno podejście do zagadnienia, wycucie wagi problemu oraz analiza wyników i wnioski, jakie na ich podstawie przedstawia Doktorant, świadczą o dużym doświadczeniu oraz rozległej wiedzy klinicznej na temat problemu raka piersi. W tym jednak miejscu chciałbym również przedstawić moje wątpliwości odnośnie 2 elementów, których brak mi w tych pracach. Pierwsza kwestia, to brak szerszego komentarza dotyczącego aktualnej skuteczności oznaczania węzła wartowniczego przy pomocy błękitu metylenowego zarówno w aspekcie samodzielnej metody jak i skojarzonej, np. z nanokoidem znakowanym radioaktywnie. Druga moja uwaga to wątpliwość odnośnie kwalifikacji do tego projektu pacjentek po leczeniu neoadjuwantowym. Zwłaszcza w aspekcie danych przedstawionych w kolejnej pracy, na temat konieczności usuwania co najmniej 3 węzłów wartowniczych, by wartości wyników fałszywie negatywnych były akceptowalne (<10%). Niestety, nigdzie nie znalazłem informacji na temat tego, ile węzłów wartowniczych zostało usuniętych u 9 chorych po leczeniu neoadjuwantowym. I ostatnia uwaga edytorska – w streszczeniu Doktorant podaje, że dawka radioaktywności jaka była podawana jednorazowo dla pacjentki wynosiła 100MBq, podczas gdy w pracy oryginalnej podana jest wartość 1 mCi. To stanowi 37MBq. Myślę, że jest to jedynie błąd translacyjny, jednak przy rozważaniach na temat istotności rozcieńczeń znaczników w skuteczności identyfikacji węzła wartowniczego takie szczegóły nie powinny być lekceważone. Pragnąłbym jednak podkreślić, że powyższe uwagi mają charakter raczej inspirujący do dalszych poszukiwań i wynikają pewnie z ograniczeń edytorskich, jakie narzucają czasopisma, w których prace zostały opublikowane. Natomiast nie umniejszają one w najmniejszym stopniu wartości całego dzieła.

Rozprawa uzupełniona jest o 8-stronnicowe **Streszczenie**, zarówno w języku polskim i angielskim, w którym Doktorant dokonuje zwięzłego omówienia założeń, celów, wyników i wniosków swojej pracy. Całość rozprawy doktorskiej została przygotowana z należytą dbałością o szczegóły i starannością.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja dotyczy nowatorskiego problemu badawczego, zawiera jasno postawiony cel pracy,

demonstruje nowoczesny i profesjonalny warsztat badawczy oraz prawidłowo przedstawia wyniki i wnioski z nich wynikające. Wnioski te, wynikające z pracy mają szansę bezpośrednio wpływać na praktykę kliniczną. Stąd, uważam, że rozprawa lekarza Olivera Budnera pt.: „Ocena przydatności klinicznej fluorescencji błękitu metylenowego w biopsji węzła wartowniczego w raku piersi” spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych. W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lekarza Olivera Budnera do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wartość merytoryczna pracy, jej bardzo staranne przygotowanie i potencjalne korzyści płynące z jej wyników dla praktyki klinicznej upoważniają mnie o przedstawienie Wysokiej Radzie Dyscypliny wniosku o jej wyróżnienie.

Kraków, dn. 28.01.2023r.



dr hab. n. med. Paweł Basta