

Prof. dr hab. Paweł Grieb
Zakład Farmakologii Doświadczalnej
Tel: (+48) 22 60 86 474
Fax: (+48) 22 60 86 527
e-mail: pgrieb@imdik.pan.pl

Warszawa, 07.09.2022r.

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych mgr inż. Sylwii Chełstowskiej

p.t. „Przydatność widm spektroskopii wodorowej HMRS

w diagnostyce pierwotnych nowotworów mózgu u dzieci”

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani Sylwii Chełstowskiej dotyczy roli metody spektroskopii protonowej *in vivo* w diagnostyce dziecięcych pierwotnych nowotworów mózgu. Dysertacja jest liczącym 85 stron, bardzo starannie zredagowanym opracowaniem mającym układ podobny do tradycyjnego formatu rozpraw doktorskich. Różnica polega na tym, że w miejsce zazwyczaj występujących sześciu rozdziałów dysertacji (*wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja i wnioski*) mamy do czynienia ze strukturą nieco bardziej złożoną. Oczywiście ani nie jest to błędem, ani nie zaburza czytania rozprawy. Po prostu Autorka wybrała taki sposób „poradzenia sobie” ze skomplikowaną materią spraw, które porusza w kolejnych rozdziałach.

Rozdział 1 zatytułowany *Wstęp* jest bardzo krótki (1,5 strony) i określiłbym go mianem „wstęp do wstępu”; jest w nim sprecyzowana problematyka rozprawy i podane uzasadnienie podjęcia tematu spektroskopii protonowej w zastosowaniu do oceny stopnia złośliwości pediatrycznych guzów mózgu. Pani Doktorantka tematem tym zajęła się, gdyż (cytuję) *przedoperacyjna ocena stopnia zaawansowania złośliwości zmiany pochodzenia glejowego nadal jest ograniczona (czułość wynosi 72.5%, a specyficzność tylko 65%)*.

Rozdział 2 rozprawy nosi tytuł *Spektroskopia rezonansu magnetycznego*, ale jego zakres tematyczny jest szerszy. W dwóch pierwszych podrozdziałach przedstawione są informacje dotyczące wczesnej historii rozwoju technik rezonansu magnetycznego, oraz zarys podstaw fizycznych obrazowania rezonansu magnetycznego w zastosowaniach medycznych.

W podrozdziale 2.3. zatytułowanym *Podstawy fizyczne spektroskopii rezonansu magnetycznego* objaśnione są w sposób prawidłowy i zrozumiały istota zjawiska przesunięcia chemicznego (ang.: *chemical shift*) i sposób generacji rezonansowego widma spektroskopowego. Dalej, w podrozdziale 2.4. Autorka wspomina o spektroskopii fosforowej, węglowej i fluorowej – te odmiany spektroskopii rezonansu magnetycznego znajdują w medycynie zastosowania naukowe, chociaż nie są używane w diagnostyce pacjentów. Przeczytanie tych części pracy upewniło mnie, że Pani doktorantka nie tylko przyswoiła sobie i bez wątplenia prawidłowo interpretuje teoretyczne podstawy techniki MRS, ale także dobrze rozumie ryzyka związane z różnymi czynnikami mogącymi zakłócać wynik badania spektroskopowego *in vivo* i utrudniać jego medyczną interpretację. Ostatni podrozdział tego rozdziału (2.5.) poświęcony jest protonowej spektroskopii w praktyce medycznej. Znaczną jego część zajmuje przedstawienie roli substancji, których sygnały są widoczne w widmach spektroskopowych rejestrowanych z mózgu, w metabolizmie tego organu w zdrowiu i w chorobach, ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów. Podsumowaniem tego rozdziału jest przedstawienie pięciu widocznych w protonowych widmach rezonansowych biochemicznych defektów, które wydają się być charakterystyczne dla nowotworów w obrębie mózgowia. W szczególności, zgodnie z wynikami publikowanymi przez innych autorów, ilościowe scharakteryzowanie tych defektów może być pomocne dla nieinwazyjnego (tj. przedoperacyjnego) rozpoznania stopnia złośliwości guza.

W rozdziale 3 przedstawione są hipoteza badawcza i cele badania. Hipoteza ma charakter tezy ogólnej – że spektroskopia wodorowa rezonansu magnetycznego pozwoli na odróżnienie nowotworów mózgu o niższym i wyższym stopniu złośliwości histologicznej. Cele szczegółowe badania faktycznie podają metodę, jaką Pani doktorantka miała zamiar się posłużyć, aby wspomnianą hipotezę zweryfikować przez analizę materiału własnego. Autorka postawiła sześć pytań, z których większość dotyczy oceny korelacji pomiędzy danymi spektroskopowymi a stopniem złośliwości histologicznej guza. Wydaje mi się, że w kilku pytaniach zaznaczyła się redundancja, tj. nadmiar w stosunku do tego co jest wystarczające – sądzę, że pytanie 1 zawiera w sobie pytania 2, 4 i 5. Interesującym motywem jest zagadnienie postawione w pytaniu 6, tj. czy czas echa wpływa ocenę stopnia złośliwości nowotworów.

Rozdział 4 zawiera ogólne dane dotyczące pacjentów, u których stwierdzono obecność wewnątrzmoźgowych zmian rozrostowych i wykonano badanie spektroskopowe. W ramach rozprawy doktorskiej przedstawiona jest analiza protonowych widm rezonansowych stu

trzydzieściora dzieci. Uważam, że zebranie i przetworzenie tak ogromnego materiału, i to pochodzącego z jednego ośrodka, jest osiągnięciem niezwykle. Dla porównania – niedawna publikacja o podobnej tematyce (Zarinabad i wsp.: *Application of pattern recognition techniques for classification of pediatric brain tumors by in vivo 3T 1H-MR spectroscopy-A multi-center study*. Magn Reson Med 2018;79:2359), będąca wynikiem badania w którym uczestniczyły cztery brytyjskie szpitale, zawiera dane pochodzące tylko od 41 pacjentów. Jeśli chodzi o materiał zawarty w doktoracie, to część badań wykonano metodą pojedynczego woksela (SVS), a pozostałe metodą obrazowania przesunięcia chemicznego (CSI). O ile zastosowanie metody SVS skutkowało tym, że dla 75 pacjentów uzyskano 75 widm (po jednym widmie dla każdego pacjenta), to zastosowanie metody CSI skutkowało uzyskaniem więcej niż jednego widma dla danego pacjenta. Jeśli dobrze policzyłem, to metodę CSI użyto u 57 pacjentów – ale zarejestrowano i poddano analizie 228 widm, czyli średnio 4 na jednego pacjenta. Być może umknęło to mojej uwadze – ale czy w tym przypadku kilka widm uzyskanych dla jednego pacjenta było uśredniane przed wykonaniem analizy ilościowej przy pomocy LC-modelu?

W rozdziale 5 opisana jest metodyka badań, a mianowicie sposób akwizycji widm, ich późniejsza analiza, oraz metody statystyczne (nieparametryczne) użyte następnie do oceny istotności korelacji pomiędzy danymi spektroskopowymi a klasyfikacją histologiczną guzów wyrażoną w skali WHO. Analiza widm przeprowadzana była przy pomocy specjalistycznego oprogramowania zwanego LC-Model, które nie jest – o ile wiem – standardowym oprogramowaniem tomografu rezonansu magnetycznego wykorzystywanego do akwizycji widm. Jestem pewien, że Pani doktorantka rozumie istotę procedury obróbki danych spektroskopowych tą metodą i prawidłowo wykonywała przetwarzanie danych spektroskopowych – ale powinna być przygotowana na to, że gdy w jakimś wysokiej rangi naukowym czasopiśmie złoży do druku pracę opisującą jej badania – a uważam, że powinna to wkrótce uczynić – recenzenci zapewne będą wymagali znacznie więcej informacji na temat wykonywania tej procedury.

Rozdział 6 rozprawy, który zatytułowany jest *Wyniki*, zawiera wykonanie programu uzyskania odpowiedzi na pytania sformułowane w rozdziale 3 jako „szczegółowe cele badania”. Autorka testowała statystycznie korelacje wielu par zmiennych w układzie (sygnał rezonansowy metabolitu) lub (iloraz sygnałów rezonansowych dwóch metabolitów) na osi rzędnych (pionowej) względem stopnia złośliwości guza w skali WHO na osi odciętych (osi poziomej). Jedne metabolity były ze stopniem złośliwości guza skorelowane dodatnio (np.

metabolity cholinowe), a inne ujemnie (m.in. N-acetyloasparaginian, NAA). W wielu przypadkach korelacje były bardzo silne, w innych nieco słabsze lub statystycznie nieistotne.

Na stronie 65 Rozprawy rozpoczyna się rozdział 7, czyli *Dyskusja*. Zawarte jest tam porównanie wyników uzyskanych przez Autorkę z publikacjami innych autorów. Zespół danych spektroskopowych uzyskany przez Panią doktorantkę tworzy skomplikowany obraz, z którego nie wyłonił się żaden pojedynczy metabolit lub iloraz metabolitów, który mógłby posłużyć jako samoistny wskaźnik pozwalający w sposób nieinwazyjny na jednoznaczne ustalenie stopnia złośliwości histologicznej guza mózgu. Jednak do takiego ideału zbliżają się wskaźniki będące ilorazami, które w liczniku zawierają sygnał rezonansowy metabolitu którego stężenie wzrasta wraz ze wzrostem stopnia złośliwości guza, a w mianowniku zawierają sygnał rezonansowy metabolitu którego stężenie spada wraz ze wzrostem stopnia złośliwości guza. W liczniku takiego wskaźnika mogą np. występować sygnały metabolitów cholinowych, albo mio-inozytoli – o których wiadomo, że są metabolitami odgrywającymi istotną rolę w podziałach komórek. W mianowniku natomiast mogą występować sygnały metabolitów charakterystycznych dla neuronów, a więc przede wszystkim NAA+NAAG.

Osiem stron dalej znajduje się część 8 Rozprawy zatytułowana *Trudności techniczne i kierunki rozwoju metody HMRS in vivo*. Ten fragment, stanowiący (że tak powiem) „dyskusję dyskusji”, jest bardzo krótki (liczy tylko dwie strony), ale bardzo ważny i bardzo interesujący. Po pierwsze, jest to tekst „przyjazny dla czytelnika”, łatwo się go czyta i łatwo przyswaja zawarte tam tezy. A nie są to tezy trywialne. Bardzo trafnie odzwierciedlają one i sumują przemyślenia Pani Doktorantki co do głównego celu pracy, czyli oceny przydatności spektroskopii protonowej rezonansu magnetycznego jako metody uzupełniającej przedoperacyjną diagnostykę mózgowych zmian nowotworowych u dzieci. Muszę przyznać, że po przeczytaniu tej części pracy doszedłem do wniosku, że zgadzam się z każdą zawartą tam myślą. Pierwszym trafnym spostrzeżeniem jest podkreślenie, że rozdzielczość spektroskopii jest o rząd wielkości gorsza niż rozdzielczość obrazowania strukturalnego. Drugim – że ustawiając wksel dokładnie na zmianę nowotworową należy koniecznie omijać strefy krwawienia i zwapnień, gdyż będą one źródłem artefaktów. Trzecim – że chcąc badać profil metaboliczny guza należy starać się wykluczyć zarówno strefę obrzęku, jak i martwicy. I mógłbym kolejne trafne spostrzeżenia Autorki wymieniać dalej – bo ja się zgadzam z jej wszystkimi uwagami. W szczególności z tą, która mówi, że (cytuje) *należy... pamiętać, że spektroskopia rezonansu magnetycznego nie funkcjonuje samodzielnie i żeby otrzymać pełny obraz zmiany musimy skorelować jej wyniki z oceną badań perfuzyjnych i dyfuzyjnych*. W

sumie – te dwie strony „dyskusji o dyskusji” przekonały mnie, że Pani doktorantka w bardzo trafny i bardzo przemyślany sposób przedstawiła swój pogląd na temat będący zarazem tematem jej rozprawy – na temat oceny przydatności widm spektroskopii wodorowej HMRS w diagnostyce pierwotnych nowotworów mózgu u dzieci. Czyli - tak, spektroskopia protonowa jest przydatna, ale jedynie jako uzupełnienie innych metod diagnostycznych.

Zadaniem recenzenta jest jednak także wypatrywanie w ocenianej dysertacji błędów i niedostatków. Te, które udało mi się odnaleźć, nie mają charakteru dyskwalifikującego – muszą jednak o nich wspomnieć, gdyż w przeciwnym razie sprawiłbym wrażenie, że nierzetelnie wykonałem zadanie recenzenta.

Począwszy od *Streszczenia* Pani doktorantka posługuje się dla określenia grupy pacjentów, którzy byli poddani badaniom, terminem *grupa badawcza*. Moim zdaniem *grupę badawczą* stanowili badacze, pacjenci zaś wchodzili w skład *grupy badanej*.

W rozdziale *Hipoteza i cele badania* Pani doktorantka napisała (cytuję): *spektroskopia wodorowa rezonansu magnetycznego pozwoli na zróżnicowanie nowotworów o niższym i wyższym stopniu złośliwości histologicznej*. Mnie się takie sformułowanie hipotezy nie do końca podoba, bo wygląda na „żargon naukowy”. Może zamiast słowa „zróżnicowanie” lepiej brzmiałoby słowo „odróżnienie”?

Na str. 63, czyli w ramach rozdziału 6 *Wyniki*, znajduje się podrozdział 6.6. *Czy czas echa T_E w badaniu spektroskopowym ma wpływ na możliwość oceny stopnia złośliwości nowotworów?* Mnie się wydaje, że ten fragment rozprawy powinien znajdować się w rozdziale *Dyskusja*.

Moja kolejna uwaga krytyczna dotyczy tego, że w rozprawie Pani doktorantka stanowczo zbyt duże znaczenie przypisuje medianom. Dla przykładu, w podpisie pod ryc. 15b. pojawiło się sformułowanie *Wykresy rozkładu median*, które nie jest prawidłowe. Podobnie nie jest prawidłowe zdanie z pierwszej strony *Dyskusji* (cytuję): *Według otrzymanych wyników najwięcej metabolitów wykazało statystycznie istotną różnicę median*. Statystyczna znamienność (istotność) różnicy pomiędzy porównywanymi grupami wyników nie dotyczy median, lecz statystycznych rozkładów danych. Rozkład statystyczny opisuje, w jaki sposób wartości badanej cechy są rozłożone, tj. które wartości są częste, a które występują rzadziej. Istnieje wiele rodzajów rozkładów statystycznych. Najczęściej spotykany jest rozkład normalny, który ma kształt symetrycznego dzwonu. Przy porównaniu dwóch grup wyników, których rozkłady statystyczne są rozkładami normalnymi, często używa się sformułowania, że

„średnie są statystycznie znamienne różne od siebie”. Jest to jednak typowy skrót myślowy, gdyż o statystycznej istotności różnicy pomiędzy średnimi nie świadczy sama różnica pomiędzy wartościami tych średnich. Zdarza się bowiem, że dwie średnie arytmetyczne bardzo różnią się od siebie, ale różnica ta nie jest statystycznie istotna. Dla ustalenia statystycznej istotności różnicy pomiędzy dwoma średnimi arytmetycznymi niezbędne jest uwzględnienie i porównanie wariancji (zmienności) wyników wokół każdej z wartości średnich. Podobnego skrótu myślowego nie można jednak – moim zdaniem – zastosować w przypadku porównywania zbiorów danych, których rozkłady nie są rozkładami normalnymi i są reprezentowane przez mediany. *Mediana* danego zbioru wartości oznacza wartość środkową, od której taka sama liczba wyników jest większa jak mniejsza. W przypadku rozkładu normalnego mediana jest równa średniej arytmetycznej. Ale jeśli rozkład nie jest normalny (a tak było w zbiorach danych analizowanych przez Autorkę), wyliczenie średniej arytmetycznej nie ma sensu i dlatego opisywany zbiór prezentuje się jako medianę oraz towarzyszący jej zakres obejmujący 25%-75% liczby wyników w zbiorze, z zaznaczeniem zakresu obejmującego znaczną większość wyników (tzw. wyniki niedostające), i ewentualnie także z wyróżnieniem pojedynczych wyników odstających (ang. *outlayers*). Statystycznie istotna (znamienna) różnica nie dotyczy median, lecz rozkładów cech tworzących porównywane zbiory. Może się zdarzyć, że dwa rozkłady statystycznie bardzo różnią się od siebie mimo, że ich mediany są takie same. Muszę jednak podkreślić, że powyższe uwagi nie osłabiają argumentacji Autorki, która w interpretacji różnic pomiędzy porównywanymi grupami (zbiorami) wyników zwracała faktycznie uwagę nie na różnice pomiędzy medianami, a na statystyczne prawdopodobieństwo istotności różnicy pomiędzy zbiorami danych, otrzymane w wyniku zastosowania testu statystycznego.

Powyższe uwagi krytyczne nie wpłynęły jednak na ogólnie bardzo pozytywną ocenę rozprawy. Jej tekst dowodzi, że Pani doktorantka posiada ogólną wiedzę teoretyczną w zakresie medycznych zastosowań technik rezonansu magnetycznego. Jej praca doktorska jest logicznie skonstruowana, oparta jest na wyjątkowo obszernym materiale obserwacyjnym, a postawione cele badawcze zostały osiągnięte. Uważam, że Pani doktorantka wylegitymowała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, ze szczególnym uwzględnieniem krytycyzmu wobec wyników własnej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Sylwii Chełstowskiej spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w dziedzinie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z

późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.).

W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr inż. Sylwii Chełstowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

