

Gdańsk, 15.08.2022

Prof. dr hab. Edyta Szurowska
II Zakład Radiologii
Wydział Nauk o Zdrowiu z IMMiT
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Smoluchowskiego 17
81 – 211 Gdańsk
tel/fax. +48 58 349 3680
e-mail: eszurowska@gumed.edu.pl

Opinia dotycząca rozprawy doktorskiej

Sylwii Chelstowskiej

pt. „Przydatność widm spektroskopii wodorowej HMRS w diagnostyce pierwotnych nowotworów mózgu u dzieci.”

Na podstawie pisma o sygnaturze N/DBW/RN/79/2022 z dnia 10 czerwca 2022 r. kierowanego przez Zastępcę Przewodniczącego Rady Naukowej Instytut Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie – prof. zw. dr hab. n. med. Marcina Roszkowskiego zostałam powołana na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Sylwii Chelstowskiej.

Przedłożona do recenzji rozprawa dotyczy badań nad zastosowaniem protonowej spektroskopii rezonansu magnetycznego (HMRS) w diagnostyce nowotworów mózgu u dzieci. Doktorantka porusza ważne zagadnienie dotyczące oceny stopnia złośliwości nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (OUN) z zastosowaniem wymienionej w tytule metody obrazowej i porównanie jej wyników z badaniami histopatologicznymi. Temat pracy jest istotny z punktu widzenia klinicznego, wpisuje się w trendy współczesnej medycyny tj. dążenia do zastąpienia diagnostyki inwazyjnej metodami nieinwazyjnymi i odnosi się do rozpoznania histopatologicznego jako rozpoznania ostatecznego.

Rozprawa składa się ze 85 stron, została podzielona na 11 rozdziałów, czyli nieco więcej niż w klasycznym wzorcu. Zawiera ona wstęp, wprowadzenie do tematyki spektroskopii rezonansu magnetycznego, hipotezę i cel badawczy, grupę badaną, metodykę badań, wyniki, dyskusję, opis trudności technicznych i kierunków rozwoju metody spektroskopii wodorowej *in vivo*, wnioski, a także podsumowanie i piśmiennictwo. Dysertację rozpoczyna streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis rycin, tabel i skrótów. Piśmiennictwo obejmuje 121 pozycji, z czego mniej niż 10% z ostatnich pięciu lat. W pracy zawarto 23 ryciny i dziewięć tabel. Jako radiologowi brakuje mi zdjęć różnych typów histologicznych guzów.

1. Wstęp

We wstępie Doktorantka uzasadnia potrzebę stosowania spektroskopii rezonansu magnetycznego ośrodkowego układu nerwowego w grupie pediatrycznej oraz sygnalizuje odrębności epidemiologiczne i histologiczne występowania nowotworów mózgu u dzieci i dorosłych, co bardzo utrudnia proste przeniesienie doświadczeń. Kandydatka słusznie podkreśla niewystarczającą skuteczność morfologicznego obrazowania MRI ze wzmocnieniem kontrastowym w różnicowaniu stopnia złośliwości histologicznej nowotworów mózgu, niemniej szkoda, że cytuje w tym miejscu tylko dwie dwudziestoletnie prace - doskonałą pracę Law'a 2003r i pracę Knoppa z 1999r.

2. Wprowadzenie

W kolejnym rozdziale Kandydatka wprowadza czytelnika w zagadnienia związane ze spektroskopią rezonansu magnetycznego oraz jej podstaw fizycznych, skupiając się nie tylko na spektroskopii wodorowej (HMRS), ale także węglowej ^{13}C , fluorowej ^{19}F i fosforowej ^{31}P . Autorka trafnie odnosi się do teorii kwantowych, przytacza wzory wyrażające omawiane zagadnienia, opisuje sekwencje i metody rejestracji widma. Biorąc pod uwagę, że Doktorantka jest z wykształcenia fizykiem, zamiłowanie do wzorów nie dziwi, także nie razi popularnonaukowe słownictwo w miejsce fachowego słownictwa medycznego.

W związku z najbardziej powszechnym zastosowaniem HMRS w radiologii przybliżyła w podrozdziale 2.5 charakterystyczne cechy wybranych indywiduów na widmie mas, takich jak N – acetyloasparaginin, kreatyna, cholina, mioinozytol, glutaminy i glutaminiany, mleczań, lipidy, tauryna, kwas octowy i bursztyniany, alanina, cytryniany, scyllo-inozytol oraz glicyna. Ta część wprowadzenia zawiera skomasowane w jednym miejscu informacje praktyczne, które ułatwiają ocenę badania spektroskopowego i ma znaczące walory edukacyjne.

3. Cel

Doktorantka sformułowała dość oczywistą, ale jak najbardziej poprawną hipotezę badawczą o następującym brzmieniu: „Spektroskopia wodorowa rezonansu magnetycznego pozwoli na zróżnicowanie nowotworów o niższym i wyższym stopniu złośliwości histologicznej”.

Wyróżniła cel główny zgodny z tematem dysertacji dotyczący oceny przydatności protonowej spektroskopii rezonansu magnetycznego w różnicowaniu stopni złośliwości histologicznej nowotworów mózgu u dzieci.

Cele szczegółowe Kandydatka postawiła w formie pytań:

1. Czy poziomy poszczególnych metabolitów zmieniają się w stosunku do stopnia złośliwości nowotworów wg WHO G 1,2,3,4?
2. Czy poziomy metabolitów Gly i grupy Glu_Gln korelują ze stopniem złośliwości?
3. Czy stosunki metabolitów GPC_PCh/NAA_NAAG, mIns/NAA_NAAG, Gly/NAA_NAAG, Gln_Glu/NAA_NAAG korelują ze stopniem złośliwości?
4. Czy poziomy poszczególnych metabolitów zmieniają się w stosunku do stopnia złośliwości grup nowotworów WHO G 1,2 oraz WHO G 3,4?
5. Czy sygnał kreatyny CrPCr koreluje ze stopniem złośliwości nowotworów?
6. Czy czas echa TE w badaniu spektroskopowym ma wpływ na możliwość oceny stopnia złośliwości nowotworów?

4. Materiał i metody

Materiał i metody - ta część rozprawy zazwyczaj traktowana jako jedna całość została przez Doktorantkę podzielona na dwa rozdziały: jednostronicową „Grupę badawczą” oraz dwustronicową „Metodykę badania”, co w mojej opinii nie było specjalnie celowe i zaburzało proporcje pracy.

Grupę badaną stanowiło 130 dzieci w wieku 2 – 19 lat, z czego:

- 57 pacjentów z nowotworem WHO G1, u których wykonano 33 badania HMRS metodą SVS oraz 19 badań metodą CSI
- 6 pacjentów z nowotworem WHO G2, u których wykonano 8 badań HMRS metodą SVS oraz 8 badań metodą CSI
- 25 pacjentów z nowotworem WHO G3 wykonano 14 badań HMRS metodą SVS oraz 11 badań metodą CSI
- 33 pacjentów z nowotworem WHO G4 wykonano 20 badań HMRS metodą SVS oraz 19 badań metodą CSI.

W metodyce badania jako radiologowi brakuje mi informacji o typie histologicznym nowotworu, a nie tylko stopniu jego złośliwości. Ocenie poddano obrazy spektroskopii-MRI guzów mózgu: 75 widm HMRS otrzymanych z zastosowaniem metody pojedynczego woksela oraz 228 widm HMRS otrzymanych z zastosowaniem metody CSI.

Zarówno materiał, jak i metodyka badania oraz analizy statystyczne dobrane przez mgr Sylwię Chełstowską do realizacji niniejszego opracowania naukowego oceniam jako trafne. Doktorantka wykonała badania spektroskopii-MRI aparatem o wartości indukcji magnetycznej 1,5T. Badania obrazowe z zastosowaniem spektroskopii rezonansu magnetycznego wykonano zgodnie ze standardowym protokołem stosowanym w badaniach dzieci z podejrzeniem nowotworu mózgu i zawierającym obrazy T2-zależne, sekwencje FLAIR, DWI, obrazy T2* oraz T1-zależne przed i po podaniu środka kontrastującego dożylnie.

Do rejestracji badań spektroskopowych wykorzystano metodę przesunięcia chemicznego CSI 2D i metodę pojedynczego woksela SVS, przy krótkim i długim czasie echa odpowiednio o wartościach TE - 30ms i 135ms, z czasem powtórzeń TR 1500 ms, grubością warstwy 2 cm, matrycą 16x16 cali i polem widzenia FOV 16-24 cm. Pełna analiza widm z uwzględnieniem wszystkich kroków poprawiających jakość widma została wykonana w programie LC Model.

5. Wyniki

W rozdziale „Wyniki” w sposób czytelny i przejrzysty Doktorantka w postaci tabel i licznych wykresów przedstawiła uzyskane wyniki statystyczne pod względem założonych wcześniej kryteriów. Sposób prezentacji wyników został dobrany odpowiednio. Zaprezentowane w dysertacji wykresy obrazują obliczone mediany i współczynniki korelacji z zastosowaniem metod statystycznych.

6. Dyskusja

W końcowych podrozdziałach Doktorantka omówiła wady i zalety oraz możliwości stosowania protonowej spektroskopii rezonansu magnetycznego do stopniowania guzów mózgu. Doktorantka wyjaśnia, że HMRS może być nieinwazyjną metodą wspierającą powszechnie stosowane badania molekularne i genetyczne do klasyfikacji zmiany nowotworowej pomiędzy klasą G1, G2, G3 i G4 (wraz z rosnącym stopniem złośliwości).

Kandydatka wykazała, że sygnały z metabolitów w zakresie widma HRMS odpowiadają aktywności guza mózgu. Stwierdzono istotne statystycznie różnice median w przypadku porównania stopnia złośliwości G1 i G4 oraz G1 i G3. Sześć z przebadanych metabolitów charakteryzuje istotna statystycznie (na poziomie istotności 0,05) ze stopniem złośliwości korelacja nieparametryczna:

- dodatnia: Ala/CrPCr30, Tau/Cr30, Gly/CrPCr135,

- ujemna: NAA_NAAG/CrPCr30, Glu_Gln/CrPCr30, NAA_NAAG/CrPCr135.

Badania wykazały, że im wyższe wartości metabolitów Ala/CrPCr30, Tau/CrPCr30, Gly/CrPCr135, tym wyższy stopień złośliwości oraz im niższe wartości metabolitów NAA_NAAG/CrPCr30, Glu_Gln/CrPCr30, NAA_NAAG/CrPCr135 tym wyższy stopień złośliwości.

Kandydatka wykazała, że poddając 151 wyników otrzymanych z analizy i stosując ocenę korelacji nieparametrycznej dla współczynnika Spearmana korelację dodatnią pomiędzy

stopniem złośliwości a wartością metabolitów Gly30 i Gly135 jest istotna statystycznie, a wartością metabolitu Glu_Gln30 jest istotna statystycznie, gdy korelacja pomiędzy stopniem złośliwości jest ujemna.

Mgr Sylwia Chełstowska wykonała analizy stosując testy nieparametryczne za pomocą których porównano mediany w próbach niezależnych oraz jednoczynnikowej analizy wariancji Kruskala-Wallisa dla k prób niezależnych, wyróżnionych ze względu na stopień złośliwości guza (wszystkie stopnie złośliwości WHO plus grupa kontrolna), wyodrębniono metabolity, które na poziomie istotności 0,05 nie charakteryzuje równość median i rozkładów: GPC_PCh/NAA_NAAG30, mIns/NAA_NAAG30, Gly/NAA_NAAG30, Gln_Glu/NAA_NAAG30, GPC_PCh/NAA_NAAG135, Gly/NAA_NAAG135, Gln_Glu/NAA_NAAG135. Otrzymane dane wykazały, że tylko w przypadku metabolitów GPC_PCh/NAA_NAAG30 i GPC_PCh/NAA_NAAG135 wyraźnie widoczna jest tendencja do wzrostu stopnia złośliwości wraz ze wzrostem stężenia metabolitu. Testy istotności współczynników korelacji Spearmana wskazują na istotną statystycznie korelację dodatnią pomiędzy stopniem złośliwości (zarówno w testach włączających grupę kontrolną, jak i bez grupy kontrolnej) a metabolitami GPC_PCh/NAA_NAAG30, mIns/NAA_NAAG30, Gly/NAA_NAAG30, Gln_Glu/NAA_NAAG30, GPC_PCh/NAA_NAAG135, Gly/NAA_NAAG135, Gln_Glu/NAA_NAAG135. Im wyższe wartości tych metabolitów, tym wyższy stopień złośliwości.

Doktorantka wykonała także testy U Manna-Whitneya, jednak tylko dla 2 prób, w których porównywała parami najbardziej liczne grupy guzów spośród grup WHO G1 i G4, a z uzyskanych danych dokonano porównania pod względem intensywności sygnałów do stosunku metabolitów. Dodatkowo Kandydatka wykonała analizę korelacji pomiędzy wartościami CrPCr30 i CrPCr135 a stopniem złośliwości w grupie badanej i kontrolnej oraz tylko w grupie kontrolnej. Z danych wynika, że niezależnie od tego czy grupa kontrolna zostanie wzięta pod uwagę podczas analizy czy też nie wyniki analizy są skrajnie różne. Biorąc pod uwagę dane dotyczące pacjentów grupy badanej pomiędzy poziomem zmiennych CrPCr30 i CrPCr135 a stopniem złośliwości istnieje istotna statystycznie korelacja dodatnia, natomiast włączenie grupy kontrolnej wskazuje na istotną statystycznie ujemną korelację pomiędzy CrPCr135.

Ostatnią analizą przeprowadzoną w części badawczej dysertacji była ocena przydatności czasów TE (30 i 135) za pomocą analizy wariancji (ANOVA). Pod uwagę brano również wyniki badań genetycznych i molekularnych, które są wartościami niezależnymi. Na tej podstawie oceniono czy wpływ zmiennych niezależnych na zmienną zależną (stopień złośliwości WHO) jest istotny statystycznie.

Wykonane obliczenia nie dają jednoznacznych wyników. Porównując parami regresje 1 - 2, 3 - 4, 5 - 6, Kandydatka sformułowała następujące wnioski szczegółowe:

- 1-2: czas krótki TE jest bardziej przydatny do oceny stopnia złośliwości przy pomocy koncentracji metabolitów, gdy obecność guza została zdiagnozowana (na co wskazuje wyższy współczynnik determinacji: $0,319 > 0,238$; wyższa wartość statystyki F: $12,86 > 5,40$; niższa wartość p: $1,3E-08 < 7,6E-04$).
- 3-4: podobnie w przypadku, gdy do oceny stopnia złośliwości wykorzystuje się poziomy metabolitów w stosunku do CrPCr czas krótki TE jest bardziej przydatny, jeśli obecność guza została zdiagnozowana (wyższy współczynnik determinacji: $0,378 > 0,302$; wyższa wartość statystyki F: $16,87 > 7,47$; niższa wartość p: $7,9E-11 < 4,6E-05$).
- 5-6: w przypadku, gdy do oceny stopnia złośliwości wykorzystuje się poziomy metabolitów do sygnału NAA_NAAG czas długi TE okazał się być bardziej przydatny (zarówno w próbie powiększonej o grupę kontrolną, jak i w próbie, bez grupy kontrolnej).

Brakuje mi nieco rzetelnej dyskusji w sensie odniesienia się do wyników własnych przez Doktorantkę.

Rozdział 8 powinien zostać włączony do „Dyskusji”, a jego część należałoby nazwać „Ograniczenia badania”.

7. Wnioski

Wnioski zaprezentowane przez Doktorantkę są zasadne w świetle uzyskanych wyników i odpowiadają postawionym celom.

Doktorantka udowodniła, że protonowa spektroskopia rezonansu magnetycznego jest przydatnym narzędziem w diagnostyce i ocenie guzów mózgu u dzieci. Wyniki badań uzyskane w pracy badawczej wskazują na zależności pomiędzy stosunkiem i rodzajem

metabolitów a stopniem złośliwości guzów OUN. Potwierdziła, że im wyższa wartość stosunku metabolitów Ala/CrPCr30, Tau/CrPCr30, Gly/CrPCr135, GPC_PCh/CrPCr30, GPC_PCh/CrPCr135 tym wyższy stopień złośliwości histologicznej nowotworu i im niższa wartością stos. metabolitów NAA_NAAG/CrPCr30, Glu_Gln/CrPCr30, NAA_NAAG/CrPCr135 tym wyższy st. złośliwości.

Mgr Chelstowska wykazała, że wartości median dla mIns/CrPCr30 nie korelują ze stopniem złośliwości, ale poziom mIns/CrPCr30 jest niższy w nowotworach złośliwych (G 3+4) niż łagodnych (G 1+2).

Doktorantka przeprowadziła także analizę przydatności diagnostycznej długiego i krótkiego czasu echa TE w ocenie stopnia złośliwości zmian rozrostowych i wykazała, że:

- czas krótki jest bardziej przydatny od oceny za pomocą koncentracji metabolitów oraz stosunku metabolitów względem kreatyny dla wszystkich grup złośliwości WHO
- długi czas echa stosowany jest do oceny za pomocą poziomu metabolitów względem całkowitego sygnału pochodzącego od grupy N-acetyloasparagianu.

Reasumując, celem rozprawy Pani mgr inż. Sylwii Chelstowskiej była analiza przydatności spektroskopii protonowej HMRS w diagnostyce pierwotnych nowotworów mózgu u dzieci. W mojej ocenie Doktorantka w sposób prawidłowy i wyczerpujący przeprowadziła prace badawcze, które oprócz niewątpliwiej wartości naukowej są pomocne w diagnostyce nowotworów mózgu u dzieci w codziennej pracy klinicznej. Mogą też stanowić podstawę do prowadzenia kolejnych badań w tym temacie. Jako mocne strony pracy należy uznać:

1. Ciągłe aktualny klinicznie i ambitny temat badawczy, który udało się zrealizować.
2. Bardzo dużą grupę badawczą - 130 dzieci z guzami mózgu, których stopień złośliwości został potwierdzony histopatologicznie.
3. Bardzo dobra metodyka badania spektroskopowego, wypracowana w trakcie wieloletnich badań klinicznych u dzieci w ośrodku o olbrzymim doświadczeniu, w którym Doktorantka prowadziła badania.
4. Rzetelnie przeprowadzona analiza statystyczna.
5. Dobrej jakości ryciny i tabele.


6. Dobrze napisane wprowadzenie zwłaszcza rozdział 2.5, który stanowi swoiste kompendium wiedzy odnośnie klinicznej interpretacji poziomów metabolitów w spektroskopii-MRI.
7. Ambitne założenia pracy i cele zwłaszcza szczegółowe, które udało się w większości zrealizować.

Za słabsze strony pracy uznaję:

1. Zbyt rozdrobnioną strukturę pracy (zbyt duża liczba rozdziałów - 11 rozdziałów, „Opis trudności technicznych i kierunków rozwoju metody spektroskopii wodorowej *in vivo*” powinien zostać włączony do dyskusji).
2. Brak proporcjonalności pomiędzy długością rozdziałów (np. „Wprowadzenie” liczące 27 stron vs „Dyskusja” – 7 stron vs jedna strona „Grupa badawcza”).
3. Zastępowanie języka medycznego popularnonaukowym.
4. Dość swobodne stosowanie interpunkcji.
5. Spis skrótów nie jest uszeregowany alfabetycznie, ponadto pisownia symboli nie jest spójna
6. Zbyt mała liczba publikacji w piśmiennictwie z ostatnich pięciu lat.

Powyzsze uwagi nie obnizaja wartosci merytorycznej pracy i maja mniejsza wage niz jej zalety.

Oceniam **pozytywnie**, tak pod wzgledem formalnym jak i merytorycznym rozprawe doktorska Sylwii Chelstowskiej „Przydatnosc widm spektroskopii wodorowej HMRS w diagnostyce pierwotnych nowotworow mozgu u dzieci”, ktora spelnia warunki okreslone w ustawie z dnia 4 lutego 1994 r. (z pozniejszych zmianami) o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz.U. z 2019 r., poz. 1231, z pozn. zm.), zwracam sie jednoczesnie do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie o przyjecie pracy i dopuszczenie jej autorki do dalszych etapow przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,
Kierownik
II Zakładu Radiologii

prof. dr hab. med. Edyta Szurowska
Edyta Szurowska