

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marcina Michała Sińczuka, zatytułowanej:
„Termometria *in vivo* mózgu z wykorzystaniem widma Spektroskopii Rezonansu Magnetycznego
(MRS) pojedynczego woksela”

zrealizowanej pod kierunkiem promotora Prof. dr hab. Piotra Bogorodzkiego,
w Instytucie Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcz PAN

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Marcina Sińczuka dotyczy zastosowania Spektroskopii Magnetycznego Rezonansu Jądrowego (ang. Magnetic Resonance Spectroscopy - MRS) do nieinwazyjnego pomiaru temperatury mózgu w warunkach *in vivo*. Metoda ta, znana jako termometria MRS (MRSt), opiera się na zależności temperaturowej częstotliwości wybranych linii w widmach protonowych metabolitów w mózgu. W pracy prowadzącej do powstania rozprawy, Autor podjął się opracowania i oceny nowatorskiej metody pomiaru temperatury, polegającej na wykorzystaniu widm kalibracyjnych MRS wody (tzw. widma bez tłumienia/supresji wody). Widma takie są standardowo wykonywane przed właściwym pomiarem diagnostycznym w celu ustawienia optymalnych parametrów pracy aparatury. Widma diagnostyczne wykonywane są w warunkach stłumionego sygnału wody (z supresją wody), w celu wyeksponowania mniejszego o kilka rzędów wielkości sygnału od metabolitów.

Rozprawa doktorska, zawarta na 131 stronach, podzielona jest na dwie części: pierwszą zawierającą wprowadzenie i przegląd literaturowy (rozdziały 1-3) oraz drugą poświęconą badaniom własnym (rozdziały 4-6). Ponadto zawiera Streszczenie w języku polskim i angielskim, Spis treści, Bibliografię (113 pozycji), trzy Załączniki zawierające szczegółowe dane wyjściowe do rozdziałów omawiających wyniki badań własnych, Wykaz skrótów, Wykaz symboli, Spis rysunków oraz Spis tabel.

Rozprawa ma charakter doświadczalny. We wstępie do jej pierwszej części, Autor jasno sformułował tezę, zakładając że niestłumiony pik wody z widm kalibracyjnych sekwencji MRS – PRESS, może zostać wykorzystany do pomiarów *in vivo* temperatury mózgu z substopniową dokładnością. Ponadto wskazał na kilka pośrednich celów pracy, prowadzących do potwierdzenia założonej tezy, takich jak:

- opracowanie metodyki wykorzystania dostępnych klinicznych zestawów danych MRS-PRESS,
- opracowanie procedury kalibracyjnej pozwalającej na pomiar temperatury w jednostkach bezwzględnych,

- przeprowadzenie pomiarów z zastosowaniem zaproponowanej metodyki z wykorzystaniem danych uzyskanych z badań *in vivo*.

W rozdziale drugim tej części rozprawy, Autor przybliżył podstawy oraz aspekty techniczne metody spektroskopii zlokalizowanej rezonansu magnetycznego (MRS), zaś w rozdziale trzecim przedstawił obszerny i szczegółowy przegląd dotychczasowej literatury dotyczącej, opartej na MRS, termometrii (MRSt) oraz wskazał zasadnicze formuły matematyczne pozwalające na wyliczenie wartości liczbowych temperatury, na podstawie analizy przesunięć chemicznych linii wody i metabolitów w widmach protonowych mózgu *in vivo*. Analiza literatury dotyczącej MRSt przeprowadzona w tej części rozprawy świadczy o dogłębnym zapoznaniu się Doktoranta z tematyką wyznaczania temperatury na podstawie parametrów widma MR. Z kolei podrozdziały poświęcone podstawom MRS, w ogólności zostały sformułowane poprawnie i czytelnie, aczkolwiek zawierają kilka niejasnych sformułowań dotyczących zagadnień merytorycznych, wymagających doprecyzowania podczas obrony.

W części poświęconej badaniom własnym, w rozdziale czwartym Autor omawia kolejne etapy służące do realizacji wymienionych we Wstępie poszczególnych celów pracy, a mianowicie: uruchomienie autorskiej aplikacji TermoM do obróbki i analizy widm MRS w kontekście wyznaczenia temperatury, opracowanie fantomu i procedury kalibracji wzorcowych widm MRS wybranych metabolitów oraz procedury realizacji pomiarów zmian temperatury mózgu podczas długotrwałych badań fMRI, a także pomiarów temperatury w zmianach nowotworowych w mózgu.

W rozdziale piątym, podzielonym na trzy podrozdziały, Autor przedstawia wyniki prac własnych, dotyczących:

- analizy danych kalibracyjnych uzyskanych z wykorzystaniem fantomu MRS,
- wpływu długotrwałych badań fMRI wolontariuszy na temperaturę mózgu,
- pomiarów temperatury zmian nowotworowych mózgu pacjentów.

Analiza danych spektroskopowych uzyskanych dla fantomu MRS pozwoliła na skonstruowanie krzywych kalibracyjnych pozwalających powiązać temperaturę z parametrami linii widmowych ¹H MRS wybranych metabolitów, co Autor wykorzystał do analizy danych otrzymanych z badań *in vivo*.

Analizując badania MRSt dla 146 ochotników (77 mężczyzn, 69 kobiet), wykonane przed oraz po badaniu fMRI, we wszystkich przypadkach Autor stwierdził statystycznie znaczący substopniowy spadek temperatury, zarówno dla widm WU jak i WS. Ponadto wykrył że spadek temperatury po badaniu fMRI jest większy u mężczyzn, przy czym różnice osiągają istotność statystyczną dla większości metod opartych na NAA i Cr, podczas gdy dla metod opartych na Cho mają charakter trendu. Stwierdził również znaczne różnice (dochodzące do 2,72 °C) w wyznaczeniu absolutnych wartości temperatur, przy wykorzystaniu linii pochodzących od różnych metabolitów.

W przypadku pomiarów MRSt u pacjentów z guzami mózgu (6 pacjentów), Autor stwierdził znaczne, (i również zależne od wybranego metabolitu) różnice wyznaczonych bezwzględnych wartości temperatur pomiędzy tkanką zdrową i nowotworową. W porównaniu do wyników fMRI, wyraźnie większe i uznane za istotne statystycznie zostały różnice temperatur między zdrową tkanką mózgu a guzem uzyskane dla widm bez saturacji (zależnie od metabolitu wynoszące pomiędzy 1,55°C a 2,41°C). Wyniki dla widm z saturacją wody wykazały dużo mniejsze różnice temperatur (tab. 6, rys. 36) i nie zostały wskazane jako statystycznie istotne.

Dla obu badanych zagadnień konkluzje co do istotności uzyskanych różnic zostały poparte szczegółowymi testami statystycznymi. Dla każdego omawianego zagadnienia, Autor zamieścił reprezentatywne przykłady widm, zaś kompletne tabelaryzowane dane będące wynikiem analizy wszystkich widm zamieścił w Dodatkach.

W ostatnim, szóstym rozdziale rozprawy Autor zawarł zgrabnie zredagowane zwięzłe podsumowanie oraz wnioski końcowe. Zamieścił nim również krótkie odniesienie do wcześniej opublikowanych prac, w tym do oryginalnych artykułów w których powstaniu Autor rozprawy miał udział [pozycje 105 i 106 w Bibliografii].

Zawartość tej części rozprawy wskazuje że Autor przeprowadził wszystkie zaplanowane prace metodologiczne i badawcze, dzięki którym otrzymał wyniki uzasadniające postawioną tezę o możliwości wykorzystania protonowych widm MRS bez supresji wody oraz wybranych linii (NAA, Cr, Cho) z widm metabolitów mózgowych z supresją wody, do wyznaczenia temperatury mózgu w warunkach *in vivo*. Możliwość taką zilustrował i krytycznie przedyskutował na dwu zagadnieniach merytorycznych: pierwszym wskazującym na zauważalne obniżenie temperatury mózgu podczas długotrwałych sesji fMRI z udziałem ochotników, oraz drugim gdzie wykazał wyraźnie podwyższoną temperaturę w obszarze guzów nowotworowych mózgu u pacjentów klinicznych.

Oryginalny wkład Autora polegał na wykorzystaniu w tym celu pików wody w widmach bez supresji (kalibracyjnych), co jest istotną nowością w stosunku do wcześniejszych prac, które już od szeregu lat wskazywały na możliwość wykorzystania techniki MRSt do wyznaczenia temperatury mózgu *in vivo*. Ponadto wkład Autora polegał na przygotowaniu odpowiedniego oprogramowania do wczytania, wstępnego przetworzenia i właściwej analizy danych, pozwalającej na podstawie względnych zmian przesunięć chemicznych linii widmowych, wyliczyć temperaturę wybranego obszaru mózgu, opracowaniu fantomu i wykonania kalibracji, i ostatecznie przeanalizowaniu uzyskanych wcześniej wyników MRS z dwu eksperymentów.

Uzyskane wyniki są bardzo wartościowe z punktu widzenia praktycznych aspektów wykorzystania termometrii MRS. Przeprowadzenie szczegółowych analiz statystycznych

pozwoliły wiarygodnie ocenić potencjał zaproponowanej metody. Wyniki przedstawione zostały w czytelny sposób, pozwalając na prześledzenie procesu uzyskania końcowych wniosków oraz oceny ich jakości, co pozwala na racjonalną ocenę wykorzystania metody MRSt w przyszłych badaniach.

Tym niemniej, Autor nie ustrzegł się pewnych nieścisłości lub braku precyzji w użytych sformułowaniach na które z obowiązku recenzenckiego zwracam uwagę, oczekując ich przedyskutowania podczas obrony:

1. W kontekście równań 14 i 15 na stronie 17, proszę przedyskutować od jakich parametrów, zgodnie z rozkładem Boltzmanna, zależy obsadzenie stanów energetycznych dla spinu 1/2, a w szczególności proszę wyliczyć te obsadzenia dla przypadków teoretycznych granicznych temperatur (to jest $T = 0$ oraz $T = \infty$) oraz porównawczo dla temperatury pokojowej (i/lub fizjologicznej).
2. Proszę o wyjaśnienie na czym polega korekta ("shimowanie") niejednorodności pola magnetycznego (pochodzących od "magnesu, sondy lub próbki" jak to zostało sformułowane w rozprawie) wykonywana przed pomiarami MRI/MRS, a w szczególności uzasadnić czy w tym celu potrzebne jest zmienne pole magnetyczne, jak wynikałoby z informacji podanej na stronie 30 rozprawy.
3. W kontekście rys 29A, proszę przedyskutować kontrolę jakości widm (na etapie pomiarów oraz analizy). Jak można wnioskować z zamieszczonych na rysunku wartości FWHM, niezbyt wysoka wartość wyliczonego współczynnika korelacji wynika z uwzględnienia w obliczeniach wszystkich wartości FWHM, których relatywnie niewielka liczba (kilka - kilkanaście), wyraźnie odbiega od pozostałych. Być może jest to skutek gorszej jakości pomiaru lub analizy. Odrzucenie ich (jako tzw. "outliers" – wartości odstających) pozwoliłoby uzyskać współczynnik korelacji dużo lepiej opisujący zachowanie znakomitej większości uzyskane danych pomiarowych. Czy taka analiza była przeprowadzona w tym przypadku?

Ponadto, przedstawione w rozprawie wyniki wskazują na kilka zagadnień które warto byłoby poddać dalszym analizom, pozwalającym na pełniejsze scharakteryzowanie metodologii termometri MRS, w kontekście jej zastosowania w szczególnych przypadkach. W związku z tym, proszę o przedyskutowanie podczas obrony i wyrażenie własnego poglądu odnośnie poniższych aspektów:

1. Bezwzględne wartości temperatur wyznaczone dla różnych linii widma (NAA, Cho, Cr) wykazują systematyczne różnice. Czy byłaby możliwa taka kalibracja metody, aby te różnice zniwelować, a otrzymane wartości były możliwie najbardziej zbliżone do rzeczywistej temperatury tkanki?

2. Generalnie pomiędzy wynikami otrzymanymi dla widm WS i WU stwierdzono korelacje, z dokładnością do offsetu temperatury, wynoszącego ok. 0.5 °C. Jaka może być przyczyna tego efektu, a w szczególności czy jest on związany tylko z linią wody w widmie WU? Czy nie należałoby się tu spodziewać raczej efektu zależnego od parametrów impulsów nasycających linię wody w widmach WS?
3. Porównując przedstawione wyniki otrzymane dla widm kalibracyjnych, efektu temperaturowego fMRI oraz dla tkanki zdrowej vs. nowotworowej w mózgu, wydaje się że o ile w dwu pierwszych przypadkach, widma WU nie okazały się być lepsze od widm WS, do wyznaczenia zmian temperatury, to w przypadku trzecim wykorzystanie widma WU wydaje się być zdecydowanie bardziej efektywne. Jaki może być tego powód? Czy może być to związane z różnicami między widmami tkanki zdrowej a nowotworowej? Proszę o przedyskutowanie tego zagadnienia w kontekście różnic między widmami tkanki zdrowej i nowotworowej w mózgu.

Uwagi te nie umniejszają w zasadniczym stopniu mojej pozytywnej oceny całości rozprawy, którą uważam za bardzo wartościową i przydatną dla przyszłych badań z wykorzystaniem tej metody.

W związku z tym, stwierdzam że, przedstawiona przez mgr inż. Marcina Michała Sińczuka, rozprawa doktorska zatytułowana „Termometria *in vivo* mózgu z wykorzystaniem widma Spektroskopii Rezonansu Magnetycznego (MRS) pojedynczego woksela”, spełnia zwyczajowe i ustawowe wymagania (ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku - Dz. U. 2018, poz. 1668. z późn. zmianami) stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Marcina Michała Sińczuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Władysław Węglarz, prof. IFJ PAN