

Prof. IFPS dr hab. n. o zdr. inż. Tomasz Wolak
Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu w Warszawie
Naukowe Centrum Obrazowania Biomedycznego

Kajetany, 26.09.2023

Recenzja

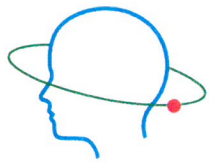
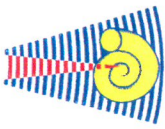
rozprawy doktorskiej lek. wet. Karoliny Owsieńskiej-Schmidt pt. „**Dynamika zmian rdzenia kręgowego w obrazowaniu tensora dyfuzji (DTI) na modelu zwierzęcym**”

wykonanej w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów, Wydziału Medycyny
Weterynaryjnej,
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

pod kierunkiem Profesora UPWr dr hab. Marcina Wrzaska
oraz Profesor UMW, dr hab. Anny Zimny

W przedstawionej mi do recenzji pracy, podjęty został temat oceny przydatności badań obrazowych wykonywanych w rezonansie magnetycznym metodą tensora dyfuzji do obiektywnej oceny struktury rdzenia kręgowego na poziomie tkankowym. Badania przedstawione w pracy doktorskiej zostały przeprowadzone w oparciu o dwa modele zwierzęce, był to model świni oraz psa. Zagadnienie jest niezwykle ważne, ponieważ uszkodzenia rdzenia kręgowego prowadzą do poważnych konsekwencji skutkującym często kalectwem lub śmiercią pacjenta. Stale rosnąca liczba pojazdów mechanicznych, w tym samochodów, hulajnóg elektrycznych, rowerów, mimo poprawy standardów bezpieczeństwa, wciąż powoduje wzrost liczby wypadków komunikacyjnych, których skutkiem są poważne urazy kręgosłupa. Jeszcze większym problemem w obecnych czasach są zwyrodnienia kręgosłupa związane z niewłaściwą postawą ciała, szczególnie w pozycji siedzącej. Dotyczy to szczególnie dzieci i młodzieży, które wiele godzin spędzają używając smartfonów lub komputera w pozycji pochylonej do przodu. O ile osoby w młodym wieku mają dużą elastyczność kości i głównym objawem jest po prostu krzywy kręgosłup, jeszcze bez objawów bólowych, to w przypadku osób dorosłych często doświadczają one bólu uniemożliwiającego codzienne funkcjonowanie. Szczególnie praca biurowa przy komputerze i brak aktywności ruchowej sprawia, że gorset mięśniowy utrzymujący prawidłową pozycję ciała przestaje wystarczać i duże przeciążenia przenoszą się bezpośrednio na układ kręgowy. To z kolei prowadzi do przemieszczeń dysków międzykręgowych lub ich odwodnienia i zmniejszonej amortyzacji pracy kręgow. Problem ten niestety narasta i potrzebne są obiektywne metody badań, które w wiarygodny sposób będą w stanie pokazać stopień uszkodzenia rdzenia oraz przedstawić prognozę dalszego powrotu do zdrowia. Zagadnienia z tego obszaru mają istotne znaczenie w zakresie neurologii, neurochirurgii oraz fizjoterapii.

Układ pracy jest logiczny a sama praca napisana jest poprawnym naukowym językiem. Rozprawa doktorska liczy 105 stron (nie licząc dołączonej publikacji). Składa się z 7 części, z których pierwsza stanowi część teoretyczną. Pozostałe rozdziały zawierają opis badań własnych i przeprowadzonych analiz oraz uzyskane wyniki. W ostatnich rozdziałach Autorka zamieściła dyskusję wyników, wnioski, ograniczenia i przyszłe kierunki rozwoju. Praca przygotowana jest bardzo starannie, ponadto zawiera spis skrótów, spis tabel i rycin co pomaga w nawigowaniu i czytaniu.



Zakres literatury, podanej przez Autorkę dysertacji jest bardzo szeroki, zawiera 177 pozycji i w pełni odpowiada tematyce podjętych zagadnień. W moim przekonaniu dobór i wykorzystanie źródeł jest prawidłowe. Liczba pozycji bibliograficznych, z czego ponad 40% pochodzi z ostatnich 5 lat, świadczy o dobrej znajomości starszej i najnowszej literatury w tej dziedzinie.

Uwagi dotyczące wprowadzenia teoretycznego:

Wstęp teoretyczny dotyczył ogólnej charakterystyki uszkodzeń rdzenia kręgowego u ludzi i zwierząt. Autorka omawia patofizjologię ostrego uszkodzenia rdzenia kręgowego oraz bariery utrudniające jego regenerację w szczególności przedstawia uszkodzenia związane z dyskopatią u psów. W dalszej części opisuje konwencjonalne metody diagnostyczne uszkodzeń rdzenia kręgowego oraz charakteryzuje zaawansowane techniki neuroobrazowania w tym technikę DTI. Warto zauważyć, że technika DTI rozwija się w dwóch kierunkach. Pierwszy dotyczy zastosowań klinicznych w których stawia się akcent na jak najkrótszy czas trwania sekwencji dyfuzyjnej przy ograniczonej dokładności wyznaczania parametrów dyfuzji. Drugi kierunek dotyczy badań naukowych związanych z obrazowaniem connectom-u ludzkiego mózgu co wymaga skanerów o indukcji 3T lub więcej oraz bardzo silnych gradientów pola magnetycznego. W tym przypadku stosuje się również bardziej zaawansowane algorytmy rekonstrukcji traktów nerwowych jak np diffusion spectrum imaging zamiast diffusion tensor imaging. Zapewne w niedalekiej przyszłości tego typu sekwencje będą również dostępne dla skanerów klinicznych, jednakże w przypadku skanera jaki był używany do badań opisanych w niniejszej pracy, tego typu sekwencje były niedostępne lub czas ich trwania był zdecydowanie za długi. Natomiast o różnicy między sekwencjami dostępnymi klinicznie a tymi używanymi do badań naukowych niech świadczy porównanie w ilości traktów nerwowych zrekonstruowanych w ludzkim mózgu. W przypadku sekwencji klinicznych jest to kilka-kilkadziesiąt tysięcy w porównaniu do ok miliona traktów zrekonstruowanych z sekwencji naukowych.

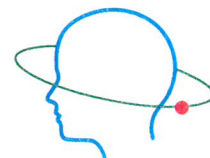
W dalszej części wstępu teoretycznego omówiono stosowane dotychczas terapie uszkodzeń rdzenia kręgowego u ludzi i zwierząt oraz przyszłe kierunki badań w tym zakresie.

Wybór tematu pracy doktorskiej, uważam za bardzo trafny i aktualny. Poruszone zagadnienie jest istotne nie tylko ze względów naukowych ale również ze względów klinicznych. Wstęp teoretyczny przedstawiony w pracy jest dobrze wyważony i adekwatny do tematu podjętego przez Autorkę.

Uwagi dotyczące celu badań, hipotez oraz wyboru metod badawczych:

Temat i cele badań są sformułowane jasno i precyzyjnie. Badanie to, ze względu na złożoną technicznie procedurę badań, a także przeprowadzenie własnych pomiarów i obserwacji, połączonych z umiejętnością posługiwania się nowoczesnymi narzędziami, było trudne do wykonania.

Zaproponowana ocena dynamiki zmian mikrostruktury rdzenia kręgowego na dwóch modelach zwierzęcych 1) nieuszkodzonego, rosnącego rdzenia kręgowego na modelu świni domowej oraz 2) uszkodzonego rdzenia kręgowego na modelu psa z chorobą kompresyjną rdzenia kręgowego w przebiegu spontanicznej przepukliny krążka międzykręgowego, przed i po zastosowanym leczeniu chirurgicznym, jest w moim przekonaniu klinicznie uzasadniona.



Za istotne uważam fakt, że badania z pierwszej części doktoratu zostały opublikowane w recenzowanym czasopiśmie *Animals*. Praca, której pierwszą autorką jest Pani Karolina Owsieńska-Schmidt nosi tytuł "Porcine Model of the Growing Spinal Cord—Changes in Diffusion Tensor Imaging Parameters".

Nie znalazłem żadnych innych badań rdzenia kręgowego techniką DTI na modelu zwierzęcym świni. Większość badań z użyciem tej techniki dotyczy ludzkiego rdzenia kręgowego lub modeli zwierzęcych takich jak szczury, myszy lub małpy. Technika DTI pozwala na ocenę struktury rdzenia kręgowego poprzez pomiar dyfuzji wody wzdłuż włókien nerwowych. Jest to przydatna metoda diagnozowania i monitorowania chorób rdzenia kręgowego, takich jak urazy, guzy, zapalenia czy zwyrodnienia. Jednakże technika ta ma też pewne ograniczenia, takie jak niska rozdzielczość przestrzenna, zakłócenia artefaktami ruchu czy trudności w interpretacji danych. Dlatego też trwają badania nad ulepszeniem tej techniki i jej zastosowaniem do innych modeli zwierzęcych.

Należy przyznać, że zaprezentowany ciąg badań i stawianych hipotez stanowi bardzo interesujący temat rozprawy i w mojej ocenie badania tego typu mogą wnieść istotne informacje dotyczące zmian w obrębie rdzenia kręgowego spowodowanych urazem lub zwyrodnieniem.

Uwagi dotyczące charakterystyki badanych zwierząt:

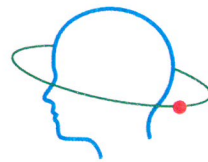
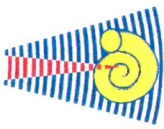
Doktorantka uzyskała wymagane pozwolenia od Lokalnej Komisji Etycznej na badania na doświadczalnym modelu zwierzęcym świni. W przypadku drugiej części na modelu psa, badania nie wymagały zgody lokalnej komisji, ponieważ psy były pacjentami weterynaryjnymi i opisywane procedury obrazowe realizowane były jako badanie diagnostyczne nie wymagające pozwoleń Lokalnej Komisji Etyki. Właściciele zwierząt wyrazili zgodę na wykorzystanie wyników badań obrazowych do pracy naukowej.

Zważywszy na to, że badania zwierząt są bardzo wymagające, należy spodziewać się, że badane grupy nie będą liczne. W modelu świni przebadano 19 zwierząt w trzech grupach wagowych. W efekcie w poszczególnych podgrupach znalazło się odpowiednio 5 świń o wadze do 29kg, 6 świń o wadze między 30-59 kg i 8 świń o wadze powyżej 60kg. Jeśli chodzi o model psa to w badaniach uwzględniono 9 zwierząt. Z punktu widzenia statystycznego liczebność tych grup jest zbyt mała aby uwzględniać je jako grupy reprezentatywne. Niniejsze badania należałoby potraktować jako zbiór pojedynczych przypadków.

Niemniej badane zwierzęta zostały dokładnie opisane, podobnie jak przygotowanie zwierząt do badań i sama procedura badawcza.

Uwagi dotyczące metody badań:

Metodyka badań została również szczegółowo opisana. Badania przeprowadzono na skanerze 1.5T o maksymalnej amplitudzie gradientu 33 mT/m przy użyciu 16-kanalowej cewki do głowy i kręgosłupa. Zastosowanie skanera o takich parametrach powoduje, że należy ustalić kompromis pomiędzy rozdzielczością przestrzenną badania a czasem badania, który znacząco się wydłuża w przypadku zwiększania rozdzielczości przestrzennej. Nie znalazłem informacji o czasie trwania poszczególnych sekwencji oraz całej procedury, proszę o uzupełnienie tych informacji. W przypadku protokołu badania psów zamienione zostały wartości parametrów czasu repetycji TR i



czasu echa TE. Wartości te zostały podane odwrotnie tj dla TR podano wartość TE a dla TE wartość TR.

Uwagi dotyczące metod analizy badań:

Do oceny parametrycznej wykorzystano dwa podstawowe parametry tensora dyfuzji a mianowicie FA oraz ADC. W przypadku rdzenia kręgowego te dwa parametry powinny być wystarczające. Zastosowane analizy statystyczne są adekwatne do założeń pracy.

W przypadku ręcznego wyznaczania regionów zainteresowania często stosuje się metodę polegającą na zaznaczeniu regionu zainteresowania przez minimum 3 niezależne osoby aby zmniejszyć wpływ subiektywnej oceny pojedynczej osoby. W tym wypadku oceny dokonywała jedna osoba co może wprowadzać niewielki bias na uzyskane rezultaty.

Kolejną rzeczą jest to, że prawdopodobnie ze względu na niską rozdzielczość obrazu regiony zainteresowania były wyznaczane w płaszczyźnie strzałkowej. Autorka wspomina w dyskusji, że jest to ograniczenie tego podejścia ale powołuje się na inne prace prezentujące identyczną metodę.

Uwagi dotyczące prezentacji wyników badań własnych:

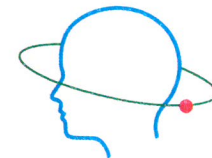
W tabeli prezentującej średnie parametry dyfuzji dla świń brakuje kilku wartości, jaki jest powód braku tych danych?

Z ilu wokseli składały się regiony zainteresowania?

Praca zawiera poza tabelami w których zestawione są zmierzone parametry dyfuzji także słowne podsumowanie wyników oraz ilustracje w postaci wykresów liniowych, słupkowych lub pudełkowych z zaznaczeniem wartości Min i Max, kwartyli i mediany.

Uwagi dotyczące dyskusji wyników i wniosków:

Autorka przedstawia wyniki badań nad zastosowaniem świń rasy polskiej białej jako modelu nieuszkodzonego, rosnącego rdzenia kręgowego. Wykorzystując metodę tensora dyfuzji, oceniła zmiany parametrów anizotropii frakcjonowanej i dyfuzyjności wody w zależności od wieku i masy ciała zwierząt. Wykazała, że wartości FA rosną, a ADC maleją wraz z wzrostem i dojrzewaniem rdzenia kręgowego, co jest zgodne z procesem mielinizacji i upakowaniem włókien istoty białej. Nie stwierdziła istotnych różnic między poszczególnymi odcinkami rdzenia kręgowego, ale zaobserwowała pewną tendencję do zmniejszania się wartości FA i zwiększania się wartości ADC w kierunku doogonowym. Porównała swoje wyniki z danymi z literatury dotyczącymi ludzi i innych modeli zwierzęcych, wskazując na podobieństwa i różnice w zachowaniu parametrów DTI w procesie wzrostu i starzenia się rdzenia kręgowego. Wskazała na zalety wykorzystania świń rasy polskiej białej jako modelu zwierzęcego, takie jak duży rozmiar rdzenia kręgowego, szybki wzrost i jednorodność wyników. Zwróciła również uwagę na ograniczenia swojej metodyki, takie jak wykorzystanie tylko dwóch parametrów DTI, umieszczenie ROI w środkowej płaszczyźnie sagittalnej, dysproporcja we wzroście kręgosłupa i rdzenia kręgowego oraz niski SNR (ang. signal-to-noise ratio). Zaproponowała możliwe kierunki rozwoju swojej pracy, takie jak wykorzystanie innych parametrów DTI, selektywny pomiar wartości GM i WM, użycie rezonansu 3,0T lub zastosowanie innej rasy świń miniaturowych z Getyngi.



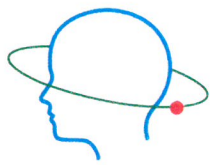
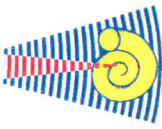
W dalszej części Autorka dyskutuje wyniki badań nad wpływem chirurgicznej dekompresji rdzenia kręgowego na parametry tensora dyfuzji (FA i ADC) u psów z międzykręgowym zwyrodnieniem dysku (ang. intervertebral disc extrusion – IVDE). Wykorzystując metodę DTI, porównała wartości FA i ADC przed i po zabiegu w trzech regionach zainteresowania (ROI): doczaszkowo, w miejscu uszkodzenia i doogonowo od uszkodzenia. Stwierdziła, że wartości FA i ADC zmieniają się znacząco po leczeniu w miejscu uszkodzenia i doogonowo od niego, co świadczy o zmianach mikrostrukturalnych rdzenia kręgowego. Zauważyła również, że wartości FA i ADC przed zabiegiem różnią się między ROI2 i ROI3, co wskazuje na doogonowe rozprzestrzenianie się uszkodzeń. Nie stwierdziła istotnych różnic między ROI1 i ROI2 po zabiegu, co sugeruje, że dekompresja rdzenia kręgowego zmniejsza różnice regionalne w parametrach DTI. Porównała swoje wyniki z danymi klinicznymi dotyczącymi stanu neurologicznego psów przed i po zabiegu. Wykazała, że u większości psów nastąpiła poprawa funkcji neurologicznych po leczeniu, z wyjątkiem jednego psa, który miał najcięższe uszkodzenie rdzenia kręgowego na poziomie mikrostrukturalnym. Zwróciła uwagę na potencjalną przydatność DTI do oceny rodzaju patologii rdzenia kręgowego i rokowania u psów z IVDE. W tej części również wskazała na ograniczenia swojej metodyki, takie jak niewielka liczba badanych zwierząt, wykorzystanie tylko dwóch parametrów DTI i umieszczenie ROI w środkowej płaszczyźnie sagittalnej.

Doktorantka podkreśliła, że nie należy wykonywać kontrolnego MR-DTI bezpośrednio po operacji, ponieważ może to prowadzić do przejściowych zmian wartości FA i ADC, związanych z reorganizacją aksonów na poziomie makroskopowym. Zaleca wykonanie kontrolnego MR-DTI 10-14 dni po zabiegu, kiedy odbywa się rutynowa kontrola pooperacyjna. Wskazuje na potrzebę uzyskania wartości DTI po dłuższym czasie od leczenia, aby ocenić proces gojenia i neuroregeneracji. Zwraca uwagę na znaczenie DTI do określenia rokowania pacjenta przed i po interwencji chirurgicznej, zwłaszcza w sytuacjach, w których stopień kompresji nie koreluje z nasileniem deficytów neurologicznych. Przedstawia również potencjalne korzyści z wykorzystania DTI w przypadku powikłań operacyjnych lub pooperacyjnych. Zaznacza, że DTI nie pozwala na rozróżnienie poszczególnych aksonów w istocie białej rdzenia kręgowego ani na identyfikację rodzaju patologii rdzenia kręgowego. Wymienia czynniki anatomiczne i fizjologiczne, takie jak ruch rdzenia kręgowego, niejednorodność pola magnetycznego czy niewielki rozmiar rdzenia kręgowego, które utrudniają uzyskanie dokładnych wyników DTI. Podkreśla rolę sztucznej inteligencji i uczenia maszynowego w przyszłym rozwoju tej metody. Na koniec zwraca uwagę na częste występowanie IVDE u jamników i buldogów francuskich oraz na specyfikę przebiegu tej choroby u tych ras.

Dyskusja poprowadzona jest w oparciu o uzyskane wyniki w porównaniu do wyników innych badań literaturowych. Wnioski wyciągnięte z pracy są logicznie przedstawione zgodnie z doktryną prac doktorskich. W pracy Autorka odniosła się również do ograniczeń zastosowanej metody jak i niewielkiej liczebności badanych zwierząt.

Uwagi dotyczące praktycznego zastosowania uzyskanych wyników badań:

Wyniki zaprezentowanych badań sugerują, że po pierwsze przedstawiony zwierzęcy model doświadczalny nieuszkodzonego rdzenia kręgowego pozwala na uzyskanie wartości referencyjnych, które mogą być ekstrapolowane do medycyny człowieka. Po drugie opisane procedury i protokół badania DTI mogą być bezpośrednio stosowane u zwierząt i ludzi. Ocena mikrostruktury rdzenia kręgowego z wykorzystaniem parametrów FA i ADC powinna uwzględniać



etap wzrostu organizmu oraz poziom na jakim doszło do urazu. Pomimo ograniczeń tej techniki, jest to jedna z metod, która może być szeroko stosowana w przyszłości do oceny stopnia uszkodzenia rdzenia kręgowego u pacjentów weterynaryjnych. Jest to również jedna z głównych metod wiarygodnej i obiektywnej oceny skuteczności różnych rodzajów terapii, w tym chirurgicznego leczenia uszkodzeń rdzenia kręgowego u psów. Kolejny praktyczny wniosek to możliwość identyfikacji fazy uszkodzenia rdzenia kręgowego, na podstawie obrazowania techniką tensora dyfuzji i to, że jest szczególnie przydatną cechą, zwłaszcza w przypadkach o niejasnej historii. Umożliwia wybór odpowiedniej terapii i całościowego zarządzania opieką nad pacjentem po urazie rdzenia kręgowego, włączając w to intensywną terapię, leczenie bólu i kontrolę oddawania moczu.

Podsumowanie:

Tematyka podjętych badań i analiz obejmuje szereg złożonych, i przez to bardzo trudnych do opisu a później interpretacji, procesów zachodzących w rdzeniu kręgowym po przebytych urazach.

Recenzowana rozprawa doktorska pt.: „Dynamika zmian rdzenia kręgowego w obrazowaniu tensora dyfuzji (DTI) na modelu zwierzęcym” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Pierwsza część badań z pracy doktorskiej została opublikowana w recenzowanym czasopiśmie. Zaprezentowane wyniki badań i analiz poszerzają wiedzę z zakresu neurologii, neurochirurgii, fizjoterapii czy radiologii i przede wszystkim świadczą o szerokiej wiedzy teoretycznej i praktycznej Autorki oraz jej umiejętności samodzielnego prowadzenia badań i stosowania nowoczesnych metod badawczych.

Uwzględniając duże znaczenie podjętych badań, ich nowatorski charakter, kompleksowość, wartości poznawcze i aplikacyjne pracy oraz dobrą znajomość Doktorantki z zakresu podjętej problematyki, umiejętności pozyskiwania oraz wykorzystania zdobytych informacji i prawidłowego wyciągania wniosków, stwierdzam, że recenzowana praca w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 t.j ze zm.) i **wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony i jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy.**

T. Wolski