



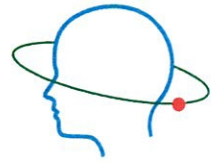
NAUKOWE CENTRUM OBRAZOWANIA BIOMEDYCZNEGO

przy Instytucie Fizjologii i Patologii Słuchu

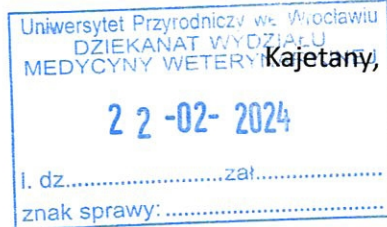
BIOIMAGING RESEARCH CENTER

at the Institute of Physiology and Pathology of Hearing

Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. n. med. Henryk Skarżyński



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



Kajetany, 12.02.2024

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. wet. Pauliny Drobot pt. „**Ocena korelacji pomiarów wolumetrycznych mózgowia w badaniach rezonansu magnetycznego z wynikami elektroencefalografii u psów z padaczką idiopatyczną.**”

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

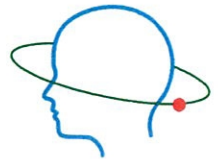
pod kierunkiem Profesora UPWr dr hab. Marcina Wrzoska

Badania przedstawione w pracy doktorskiej to badania retrospektywne i dotyczą diagnostyki padaczki idiopatycznej u psów.

W diagnostyce padaczki idiopatycznej u psów, czyli napadów o nieustalonej etiologii, MRI służy do wykluczenia innych potencjalnych przyczyn napadów, takich jak zmiany nowotworowe, torbielowate, zapalne, niedokrwienne, toksyczne, itp. Wolumetria mózgu to metoda, która pozwala na pomiar objętości poszczególnych struktur mózgu, takich jak istota szara, istota biała, komory czy płaty. Wolumetria mózgu może być przydatna do różnicowania psów z padaczką od psów zdrowych, ponieważ może wykazać drobne zmiany w objętości niektórych obszarów mózgu, które mogą być związane z padaczką. Na przykład, niektóre badania wykazały, że psy z padaczką idiopatyczną mają mniejszą objętość istoty szarej w płacie skroniowym, który jest często uważany za ognisko padaczkowe. Wolumetria mózgu może być również używana do monitorowania przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie. W medycynie ludzkiej wolumetria jest stosunkowo dobrze opracowana, dokładna i zautomatyzowana, natomiast w medycynie weterynaryjnej jest rzadko stosowana ze względu na ograniczoną dostępność standaryzowanych atlasów mózgu zwierząt oraz dużą różnorodność zwierząt i ich budowy anatomicznej. Doktorantka podejmuje więc temat, który wnosi wkład do zastosowania wolumetrii w medycynie weterynaryjnej.

Praca ma logiczną strukturę i jest napisana poprawnym językiem naukowym. Rozprawa doktorska liczy 84 strony, z czego zasadnicza część pracy zajmuje zaledwie 55 stron, nie wliczając spisu treści, literatury, rycin, skrótów i streszczeń. Praca jest starannie przygotowana, choć zawiera kilka pomyłek i literówek.

Literatura podana przez Autorkę dysertacji jest obszerna, liczy 119 pozycji i odpowiada tematyce podjętych zagadnień. Dobór i wykorzystanie źródeł jest prawidłowy. Liczba pozycji bibliograficznych, z których prawie 40% pochodzi z ostatnich 5 lat, świadczy o dobrej znajomości aktualnej i wcześniejszej literatury w tej dziedzinie.



Uwagi dotyczące wprowadzenia teoretycznego:

Wstęp teoretyczny pracy dotyczy ogólnej charakterystyki padaczki u psów. Zwróciłem uwagę na pewną nieścisłość w opisie spoczynkowego potencjału komórkowego (str. 10). Autorka pisze, że potencjał wewnątrz komórki jest ujemny, ale zaraz potem podaje dodatnią wartość potencjału i twierdzi, że "wewnątrz komórki jest o 70mV więcej niż na zewnątrz". Tymczasem jest dokładnie na odwrót - potencjał wewnątrz komórki jest o 70mV niższy niż na zewnątrz.

W dalszej części wstępu teoretycznego Autorka omawia rodzaje padaczki i związane z nimi rodzaje napadów, ze szczególnym uwzględnieniem padaczki skroniowej. Przedstawia typowe zmiany w obrazie MR w przypadku ciężkiego i długotrwałego przebiegu choroby oraz możliwości terapeutyczne padaczki, obejmujące leczenie farmakologiczne i chirurgiczne. Autorka wskazuje również, kiedy należy wykonać badanie MR i EEG, i podaje przykłady zastosowania analizy wolumetrycznej.

Uważam, że wybór tematu pracy doktorskiej jest trafny i aktualny. Poruszone zagadnienie ma znaczenie nie tylko naukowe, ale również kliniczne. 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. Postawiono dwie hipotezy. Autorka założyła, że pomimo braku zauważalnych zmian strukturalnych w badaniu MR mózgu psów z padaczką idiopatyczną istnieją dyskretne zmiany strukturalne, które mogą być wykryte poprzez pomiary wolumetryczne, które będą skorelowane z lokalizacją ognisk padaczki wykrytych w badaniu EEG.

Uwagi dotyczące charakterystyki badanych zwierząt:

W pracy wykorzystano retrospektywne badania obrazowe i zapisy EEG psów, które nie wymagały zgody komisji bioetycznej, zgodnie z oświadczeniem Autorki.

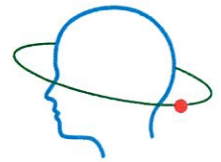
Biorąc pod uwagę, że badania zwierząt są bardzo wymagające, można się spodziewać, że badane grupy będą mało liczne. Z punktu widzenia statystycznego liczebność tych grup jest zbyt mała, aby traktować je jako grupy reprezentatywne. Niniejsze badania można potraktować jako zbiór pojedynczych przypadków.

Jednak badane zwierzęta zostały dokładnie opisane, tak samo jak kryteria kwalifikacji do badań.

Należy zwrócić uwagę, że grupa kontrolna różni się pod względem ras od grupy psów z padaczką, co może być istotnym czynnikiem różnicującym grupy.

Uwagi dotyczące metody badań:

Generalnie MRI pozwala na zlokalizowanie i ocenę ognisk padaczkowych, czyli obszarów mózgu, które są odpowiedzialne za wywoływanie napadów. Ogniska te mogą być widoczne jako zmiany w sygnale, kształcie lub wielkości istoty szarej lub białej. Jednak nie zawsze są one łatwo wykrywalne, dlatego często stosuje się dodatkowe techniki, takie jak MRI z kontrastem, MRI z dyfuzją, MRI z perfuzją, MRI ze spektroskopią lub MRI z tensorowym obrazowaniem dyfuzji (DTI).



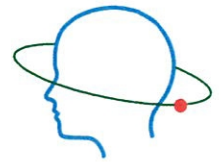
Autorka wykorzystuje wolumetrię na obrazach strukturalnych oraz wyniki badania EEG, które posłużyły do klasyfikacji grup badanych ze względu na lokalizację wyładowań padaczkowych. Rodzaj badań jest zatem ściśle dopasowany do postawionej hipotezy, choć z pewnością porównanie kilku metod dałoby pełniejszy obraz i pozwoliło sprawdzić, które z metod dają najlepsze rezultaty.

Badania przeprowadzono na skanerze 1.5T z wykorzystaniem cewki szyjno-głowej. Podano parametry sekwencji T1-zależnej, natomiast nie podano informacji o czasie całej procedury, proszę o uzupełnienie tych informacji.

Jednym z celów stawianych w pracy było stworzenie półautomatycznej metody wolumetrii z zastosowaniem dostępnych atlasów psów, polegającej na automatycznym zaznaczeniu na obrazach MRI obszarów zainteresowania, z których oprogramowanie szacuje objętość. W tym celu Autorka wykorzystwała w pierwszym etapie oprogramowanie MRICron w celu manualnej segmentacji mózgu, a następnie oprogramowanie SPM12 w celu wyznaczenia transformaty z przestrzeni natywnej badania do przestrzeni atlasowej i odwrotnie. Maski płatów skroniowych zostały utworzone poprzez transformatę odwrotną, tj. przeniesienie maski płata skroniowego z atlasu do indywidualnego obrazu mózgu danego psa. O ile oprogramowanie SPM12 jest stosowane do segmentacji obrazów mózgu, dzieląc mózg na istotę szarą, istotę białą, płyn rdzeniowo-mózgowy, to nie jest ono zalecane do segmentacji wolumetrycznej w podziale na struktury anatomiczne mózgu z atlasu w przestrzeni natywnej. Pakiet ten został stworzony w celu przetransformowania indywidualnych mózgow do przestrzeni atlasowej w celu uśrednienia wyników z badań czynnościowych mózgu. Ponieważ mózg z atlasu zawsze różni się od mózgu badanej osoby/zwierzęcia, transformata nie jest w stanie dokładnie posegmentować obszarów anatomicznych w indywidualnym mózgu. Wiąże się to między innymi z tym, że niektóre struktury mają kilka wariantów anatomicznych, natomiast atlas reprezentuje tylko jeden z tych wariantów. Jeśli zatem indywidualny mózg osoby lub zwierzęcia będzie miał inny wariant anatomiczny, to atlas nie zostanie poprawnie dopasowany do „innego” wariantu. Algorytm może wtedy „na siłę” dopasowywać dwa różne warianty obszarów anatomicznych, co powoduje niedopasowanie. W badaniach na ludziach stosuje się np. oprogramowanie FreeSurfer, które pozwala segmentować indywidualne obrazy mózgu według atlasu, przy czym jest to oprogramowanie o wiele bardziej złożone od programu SPM12. Niemniej jednak brakuje takich narzędzi do segmentacji obrazów mózgu zwierząt, więc zaproponowane rozwiązanie jest prawdopodobnie najlepszym wyborem z dostępnych narzędzi. W celu oceny jakości segmentacji wolumetrycznej skroni proszę o zaprezentowanie kilku przykładowych obrazów mózgu w przestrzeni natywnej z naniesionymi maskami tych regionów.

Jeśli chodzi o badanie EEG, to wykorzystano montaż 10-kanałowy z elektrodami igłowymi. Podano podstawowe informacje związane z procedurą badania i ustawieniami aparatury, natomiast nie podano wprost informacji, czy we wszystkich badaniach udało się wywołać napad padaczkowy w wyniku fotostymulacji lampą stroboskopową i ile było takich napadów. Czy np. w przypadku stwierdzenia lewostronnej padaczki skroniowej iglice świadczące o napadzie były tylko po lewej stronie, czy były tylko dominujące po lewej stronie?

Zarówno w przypadku badań MR, jak i EEG, brakuje oceny jakościowej badań. Zwykle w badaniach naukowych przyjmuje się używane powszechnie kryteria oceny jakościowej, aby wskazać, czy nie ma np. różnicy w jakości zapisu EEG lub jakości obrazu MR pomiędzy grupami.



Jest to jeden z potencjalnych czynników, który może zaważyć na wynikach porównań między grupami.

Uwagi dotyczące metod analizy badań:

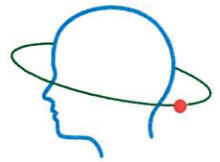
Analiza wolumetryczna obejmowała mózgowie, komory boczne oraz płaty skroniowe. Maski mózgowia oraz komór bocznych wyznaczono manualnie. Do wyznaczenia objętości płatów skroniowych zastosowano półautomatyczną metodę z zastosowaniem oprogramowania MRICron, SPM12 i 3D Slicer.

W analizie wolumetrycznej poza rozdzielczością obrazów ważnymi parametrami są kontrast tkankowy, stosunek sygnału do szumu oraz homogeniczność obrazu. Żaden z tych parametrów nie został oceniony i zareportowany. Szczególnie homogeniczność ma znaczenie przy segmentacji, ponieważ może wpłynąć na wynik automatycznych i półautomatycznych metod segmentacji. Cewka MR, która odbiera sygnał radiowy rezonansu magnetycznego, jest po prostu zbiorem anten. Rozkład elementów odbiorczych (anten) nie jest jednorodny, co powoduje, że sygnał od tego samego rodzaju tkanki (np. istoty białej) jest w różnym stopniu wzmacniany w zależności od odległości od anteny. Powoduje to, że obraz MR z założenia nie jest homogeniczny (czyli że sygnał od istoty białej w mózgu może mieć różne odcienie szarości na obrazie i nie wynika to z różnic w samej tkance, tylko od konstrukcji samej cewki MR). Z tego względu przed segmentacją obraz powinien być skorygowany pod kątem homogeniczności. Częściowo korekcja ta jest zawarta w pakiecie SPM12, ale do celów segmentacji należy skorygować standardowe ustawienia parametrów.

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 błąd na uzyskane rezultaty.

W pracy Autorka porównuje wyniki pomiarów objętościowych komór bocznych i mózgowia pomiędzy grupą 20 psów z padaczką i 10 psów z grupy kontrolnej. Choć nie ma jednoznacznej odpowiedzi na to, jak liczne powinny być grupy do testu t-studenta, to zazwyczaj im większa jest próba, tym lepiej, ponieważ zwiększa to moc testu i dokładność wyników. Jednak zbyt duża próba może być kosztowna i czasochłonna. Zaleca się, aby liczebność próby wynosiła co najmniej 30 obserwacji w każdej grupie. Test t-studenta dopuszcza różnice w liczebności grup, jednak zbyt duże różnice mogą wpływać na wiarygodność wyników. Zaleca się, aby liczebność grup nie różniła się o więcej niż 20%, natomiast w pracy porównano grupy różniące się liczebnością o 50%. Zatem może to znacząco wpłynąć na wiarygodność wyników. W mojej ocenie powinny być tu zastosowane testy nieparametryczne, np. test U Manna-Whitneya, który jest nieparametrycznym odpowiednikiem testu t-Studenta.

W dalszej części pracy Autorka przedstawia analizę statystyczną porównując objętość płatów skroniowych pomiędzy trzema grupami. Pierwsza analiza porównuje grupy psów z lewostronną lokalizacją wyładowań padaczkowych stwierdzonych na podstawie EEG z grupami psów z prawostronną lokalizacją i obustronną lokalizacją. Liczebność tych grup wynosi odpowiednio 19, 7 i 5 psów. Znow dysproporcje w liczebności grup narzucają zastosowanie testów nieparametrycznych i tym razem zastosowano nieparametryczny test ANOVA rang Kruskala-Wallisa.



Brakuje analiz regresyjnych, które sprawdzałyby np. czy wielkość komór bocznych jest skorelowana z wiekiem psów, czy jest skorelowana z czasem od wystąpienia pierwszych objawów, czy koreluje z intensywnością występowania napadów padaczkowych.

Uwagi dotyczące prezentacji wyników badań własnych:

Na stronie 43 w tabeli 2, gdzie przedstawione są dane psów z grupy kontrolnej (bez padaczki), występuje kolumna „wiek w trakcie I ataku (miesiące)”, która prawdopodobnie powinna być opisana „wiek w trakcie badania”.

Na stronie 44 Rycina 6 jest przed ryciną 5. Rycina 7 zawiera wyniki, które są bezpośrednim rezultatem dwóch poprzednich analiz z rycin 5 i 6. Mylące są oznaczenia na rysunkach, ponieważ na rysunkach 5-7 kwadracik na rysunkach oznacza średnią, a na rysunkach 8-14 oznacza medianę.

Na stronie 48 w tekście podano, że u 6/12 psów występuje korelacja pomiędzy współczynnikiem asymetrii objętości skroni (AR) a stroną wyładowań w EEG, natomiast w schemacie 2 na tej samej stronie podano informację, że u 7/12 psów występuje wspomniana korelacja.

Rycina 10 jest identyczna jak rycina 14 i różni się jedynie podpisami grup A, B, C na rycinie 10 i 1, 2, 3 na rycinie 14. Podobnie jest z rycinami 11 i 13 oraz 9 i 12. Wygląda to tak, jakby te same analizy były powielone. Jest to o tyle dziwne, że grupy 1, 2, 3 według tabeli na stronie 47 różnią się od grup A, B, C.

Najprawdopodobniej ryciny 12-14 prezentują niewłaściwe dane, tym bardziej, że mimo identycznych rysunków na stronie 49 (ryc. 9) i 51 (ryc.12) w opisie Autorka raportuje brak różnic na rycinie 9 i istotną różnicę na rycinie 12. Proszę o wyjaśnienie tych niezgodności i zaprezentowanie właściwych rycin.

Uwagi dotyczące dyskusji wyników i wniosków:

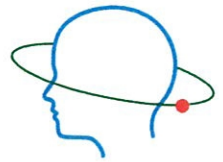
Autorka przedstawia wyniki pomiarów wolumetrycznych. Nie stwierdziła istotnych różnic w średniej objętości mózgu pomiędzy grupą kontrolną a grupą psów z padaczką idiopatyczną. Stwierdziła natomiast istotną różnicę w stosunku objętości komory bocznej do objętości mózgu. Zważywszy na bardzo małą liczebność badanych zwierząt, trudno mówić o istotności statystycznej, a tym bardziej o reprezentatywności wyników.

Na stronie 56 Autorka rozpoczęła zdanie dotyczące ograniczeń badań, ale go nie dokończyła, zdanie jest urwane.

W dalszej części Autorka dyskutuje wyniki pomiarów objętości skroni i asymetrii w wielkości skroni w stosunku do lokalizacji wyładowań padaczkowych w EEG. Stwierdziła, że nie ma istotnych różnic w asymetrii obu płatów skroniowych u psów z padaczką idiopatyczną.

Zwróciła uwagę na potencjalną przydatność zaproponowanej półautomatycznej metody wolumetrii mózgu.

Zwraca też uwagę na ograniczenia takie jak zmienność wielkości i kształtu czaszki psów biorących udział w badaniu, duża zmienność wieku psów w trakcie badania oraz zmienność wieku, w którym wystąpiły pierwsze objawy padaczki. Ponadto psy z grupy kontrolnej miały badanie z



powodu innych problemów neurologicznych, więc nie były to psy zdrowe. Doktorantka podkreśliła, że wyniki należy traktować ostrożnie ze względu na liczne ograniczenia.

Dyskusja poprowadzona jest w oparciu o uzyskane wyniki w odniesieniu do innych badań literaturowych, jednakże są to porównania jakościowe, a nie ilościowe. Wnioski wyciągnięte z pracy są logicznie przedstawione zgodnie z zasadami prac doktorskich. W pracy Autorka odniosła się również do ograniczeń zastosowanej metody oraz niewielkiej liczebności badanych zwierząt.

Uwagi dotyczące praktycznego zastosowania uzyskanych wyników badań:

Wyniki zaprezentowanych badań sugerują, że po pierwsze wolumetria mózgu nie jest metodą specyficzną, która wykazuje ścisły związek asymetrii wielkości płatów skroniowych w porównaniu do lokalizacji wyładowań padaczkowych. Być może uwzględnienie innych struktur i ocena wieloparametryczna przyniosłaby lepsze rezultaty. Po drugie większy potencjał wykazuje pomiar objętości komór bocznych, których objętość jest istotnie większa u psów z padaczką idiopatyczną w porównaniu do grupy kontrolnej. Po trzecie zaproponowana półautomatyczna metoda segmentacji i oceny wolumetrycznej po dopracowaniu szczegółów może być przydatna do analiz różnych chorób centralnego układu nerwowego u psów lub innych zwierząt pod warunkiem dostępu do wzorcowego atlasu.

Podsumowanie:

Recenzowana rozprawa doktorska pt.: „Ocena korelacji pomiarów wolumetrycznych mózgowia w badaniach rezonansu magnetycznego z wynikami elektroencefalografii u psów z padaczką idiopatyczną” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Zaprezentowane wyniki badań i analiz poszerzają wiedzę z zakresu radiologii i weterynarii oraz świadczą o umiejętności prowadzenia badań i stosowania nowoczesnych metod badawczych.

Uwzględniając zakres podjętych badań, wartości poznawcze i potencjalne wartości aplikacyjne pracy oraz dobrą znajomość Doktorantki z zakresu podjętej problematyki, stwierdzam, że recenzowana praca 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.**

Kierownik Naukowego Centrum
Obrazowania Biomedycznego

dr hab. n. o zdr. inż. Tomasz Wolak