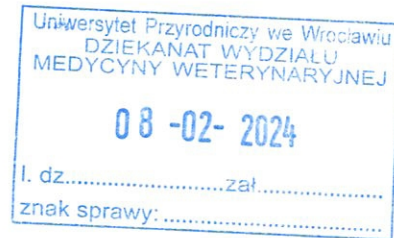


Olsztyn, 02-02-2024

Prof. dr hab. Andrzej Pomianowski
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego
w Olsztynie



RECENZJA

Zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 19 grudnia 2023 roku zostałem zobowiązany do wykonania recenzji rozprawy doktorskiej lek. wet. Pauliny Drobot nt.

„Ocena korelacji pomiarów wolumetrycznych mózgowia w badaniach rezonansu magnetycznego z wynikami elektroencefalografii u psów z padaczką idiopatyczną.”

Padaczka u psów stanowi wciąż poważny problem kliniczny, zwłaszcza dotyczy to napadów o małej podatności na leczenie farmakologiczne. Nasza wiedza na temat epilepsji u psów i tego, jak wiele form epilepsji może występować, jest wciąż podstawowa. W rezultacie nasza niezdolność do dokładnego zdiagnozowania rodzaju padaczki u chorych psów prawdopodobnie utrudnia nam możliwość optymalnego leczenia tych pacjentów. Podstawową nieinwazyjną metodą diagnostyczną w padaczce, w codziennej praktyce neurologicznej, jest badanie elektroencefalograficzne (EEG). Obrazuje ono stan czynnościowy korowej części mózgowia, której zaburzenia są przyczyną wyładowań elektrycznych, będących bezpośrednią przyczyną napadów padaczkowych. Badanie EEG nie pozwala jednak w wielu przypadkach na dokładne określenie miejsca, w którym rozpoczyna się napad, zwłaszcza jeśli jest ono położone głęboko w mózgowiu. Nie obrazuje ono także stanu strukturalnego

mózgowia, a zatem nie mówi nic na temat etiologii napadów. Służą temu techniki neuroobrazowania, spośród których najważniejszą rolę odgrywa obecnie technika rezonansu magnetycznego. Jej udoskonaleniem jest badanie wolumetryczne pozwalające na nieinwazyjny pomiar objętości wybranej struktury anatomicznej. W medycynie człowieka badanie wolumetryczne stanowi istotny element diagnostyki przedoperacyjnej w leczeniu chirurgicznym padaczki, zwłaszcza typu skroniowego. W medycynie weterynaryjnej operacyjne leczenie padaczki jest dopiero na początku drogi rozwoju a kluczowe są procedury kwalifikujące pacjenta do zabiegu takie jak badania elektrodiagnostyczne i neuroobrazowe, ponieważ warunkiem powodzenia leczenia operacyjnego jest ściśle określenie położenia ogniska padaczkowego w mózgu.

Tym trudnym zagadnieniom wychodzi naprzeciw przedstawiona do recenzji dysertacja lek. wet. Pauliny Drobot. Podjęty temat uważam za ważny zarówno ze względu na aspekt poznawczy ale również istotny dla praktyki klinicznej.

Recenzowana praca liczy 83 strony, napisana jest w języku polskim i zaopatrzona w streszczenie w języku polskim oraz angielskim z wykazem skrótów i symboli. W pracy umieszczono 3 tabele, 14 rycin i 2 schematy graficzne. Dysertacja posiada tradycyjny podział przyjęty dla tego rodzaju rozpraw. Składa się ze wstępu, założeń i celów pracy, materiałów i metod, wyników badań i dyskusji oraz wniosków z podsumowaniem. Zawiera 119 pozycji piśmiennictwa.

W obszernym wstępie Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat padaczek u ludzi i psów. Opisała różne typy padaczek oraz metody ich diagnozowania i leczenia, szczególnie odnosząc się do elektroencefalografii i neuroobrazowania metodą rezonansu magnetycznego z wykorzystaniem wolumetrii płata skroniowego. Autorka wykazuje tu dużą znajomość tematu i piśmiennictwa.

Uzasadniając podjęcie badań własnych lek. wet. Paulina Drobot stawia następujące hipotezy. Pierwszą, że konwencjonalne protokoły oceny obrazów rezonansu magnetycznego są niewystarczające do wykrycia zmian strukturalnych w mózgowiu psów z padaczką idiopatyczną. I drugą wskazującą na korelacje między lokalizacją zmian strukturalnych w mózgu a zapisem EEG.

Logicznie i jasno postawione cele pracy obejmowały:

1. Porównanie wyników objętości mózgu oraz komór bocznych i stosunku ich objętości pomiędzy grupą kontrolną, a grupą psów ze zdiagnozowaną padaczką idiopatyczną.
2. Stworzenie półautomatycznej metody wolumetrii z zastosowaniem dostępnych atlasów mózgu psów, polegającej na automatycznym zaznaczaniu na obrazach MRI obszarów zainteresowania, z których oprogramowanie szacuje ich objętość.
3. Analizę wolumetryczną płatów skroniowych u psów z padaczką idiopatyczną.
4. Korelację wyników badania elektroencefalograficznego z wynikami analizy wolumetrycznej płatów skroniowych.

Rozdział Materiały i metody zawiera informacje dotyczące zwierząt zakwalifikowanych do badań oraz metodyki przedstawionych badań przedstawionych w sposób szczegółowy i zrozumiały a zastosowane metody badawcze odpowiadają nowoczesnym standardom światowym. Badania podzielono na cztery etapy.

I etap pracy obejmował analizę wolumetryczną mózgu oraz komór bocznych, a następnie porównanie wyników objętości poszczególnych struktur oraz stosunku ich objętości pomiędzy grupą psów z padaczką idiopatyczną (grupa IE) oraz grupą kontrolną (grupa N). Do grupy IE (badanej) zakwalifikowano 20 psów ze zdiagnozowaną padaczką idiopatyczną, w tym 9 samic i 11 samców, ważących od 10 do 50 kg (średnia: 28,40 kg; mediana: 25,75 kg). Składała się ona z 17 psów

rasowych oraz trzech mieszańców. Wiek w momencie wystąpienia drgawek wahał się od 6 miesięcy do 84 miesięcy (średnia: 34 miesiące; mediana: 24 miesiące), a wiek w momencie poddania się badaniu MRI wahał się od 8 miesięcy do 108 miesięcy (średnia: 45 miesięcy; mediana: 36 miesięcy). Wszystkie psy miały w wywiadzie napady uogólnione bez napadów gromadnych lub stanu padaczkowego. Do grupy N (kontrolnej) zakwalifikowano sześć samic i cztery samce z czaszką mezocefaliczną o wadze od 11 kg do 65 kg (średnia: 29,65 kg; mediana: 28,75 kg). Ze względu na retrospektywny charakter badania składała się ona z psów, u których nie stwierdzono napadów drgawkowych i zostały one skierowane na badanie rezonansu magnetycznego z powodu innych chorób neurologicznych, które bezpośrednio nie dotyczą mózgowia i nie wpływają na jego objętość.

Badanie rezonansu magnetycznego mózgowia zostało wykonane przy użyciu skanera 1,5 Tesli (Philips Ingenia) w pozycji leżącej, grzbietowej według protokołu IVETF. Podczas badania wykonano następujące sekwencje: T1-zależne 3D, T2-zależne, FLAIR, T2*, T1-zależne 3D z podaniem środka kontrastowego. Do badania wykorzystano cewkę szyjno – głowową 1,5 Tesli (Philips). Do analizy wolumetrycznej użyto sekwencji T1-zależnej 3D [sT1W_3D, TE: 5,2 ms; TR: 25,0 ms; pole widzenia (FOV): 220mm x 220 mm, grubość warstwy: 0.8 mm, odstęp warstwy (GAP): -0.4 mm, voxel: 0.75 × 0.75 × 0.375]. Zastosowano metodę półautomatyczną przy użyciu oprogramowania 3D Slicer (wersja 4.5.0.). Do analizy danych użyto testu t-Studenta w celu porównania różnic w objętościach mózgu, komór bocznych oraz stosunku objętości układu komorowego do objętości mózgu pomiędzy grupami IE i N. Wszystkie analizy przeprowadzono przy użyciu oprogramowania TIBCO Software Inc. (2017), Statistica, wersja 13.3. Poziom istotności statystycznej ustalono na $p < 0,05$.

Drugi etap badań miał na celu stworzenie półautomatycznej metody wolumetrii płatów skroniowych. Obejmował on ręczną półautomatyczną segmentację mózgu od otaczających tkanek przy użyciu oprogramowania MRlcron v1.0.20190902. Do określenia objętości płatów skroniowych mózgu wykorzystano Stereotactic Cortical Atlas of the Domestic Canine Brain. Przetwarzanie danych obejmowało dwa procesy i wykorzystano do tego oprogramowania: Statistical Parametric Mapping 12 (SPM12) oraz 3D Slicer.

Etap III polegał na analizie wolumetrycznej płatów skroniowych u psów z padaczką idiopatyczną. Do badania zakwalifikowano 31 psów, a grupa obejmowała 22 samce i 9 samic, składających się z 23 psów rasowych oraz 8 mieszańców. Wolumetrię płata skroniowego przeprowadzono za pomocą opracowanej automatycznej metody opisanej powyżej. Do pomiarów użyto sekwencji T1-zależnej 3D. Do określenia asymetrii pomiędzy płatami zastosowano próg 6%.

Do badania w etapie IV zakwalifikowano psy, u których stwierdzono wyładowania w odprowadzeniach skroniowych. Badanie EEG zostało przeprowadzone w sedacji przy użyciu medetomidyny w dawce 20 mcg/kg podanej domięśniowo. Do rejestracji zapisu służyło urządzenie Nihon Kohden EEG (Nihon Kohden Corporation, Tokio, Japonia). Zastosowano elektrody podskórne, a każdy zapis wykonano przy użyciu 10-kanalowego montażu referencyjnego (F3, F4, C3, C4, T3, T4, O1, O2, -Ref.) ze standardowym montażem dwubiegunowym [F3-C3, C3-T3, T3-O1, F4-C4, C4-T4, T4-O2]), elektrodę referencyjną umieszczono na wysokości kości czołowej, a elektrodę uziemienia na szyi. Obecność wyładowania w odprowadzeniu skroniowym skorelowano z obecnością atrofii płata skroniowego po tej samej stronie. Testowanie normalności rozkładu danych przeprowadzono za pomocą testu normalności Shapiro-Wilka. W przypadku wartości, które nie spełniały założeń rozkładu

normalnego zastosowano test ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Zastosowana analiza statystyczna jest właściwa

W rozdziale Wyniki Autorka prezentuje rezultaty badań w poszczególnych etapach. Analiza porównawcza pomiarów stosunku objętości układu komorowego (LV) do całkowitej objętości mózgu (B) wykazała, że różnica w objętości komór bocznych była istotnie statystycznie pomiędzy grupami, większe w grupie IE ($p=0,007$). Ponadto stosunek LV:B w grupie IE był większy w porównaniu do grupy N i wartości te są istotne statystycznie ($p=0,007$). W badaniach EEG u 14/31 psów (45%) stwierdzono wyładowania w odprowadzeniach T4 (grupa A), 12/31 (38%) wyładowania w odprowadzeniach T3 (grupa B), a u 5/31 (16%) zarówno w odprowadzeniach T3, jak i T4 (grupa C). Dodatkowo utworzono tutaj podgrupy A,B,C w zależności od lokalizacji patologicznych zapisów EEG. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wartościach współczynnika asymetrii pomiędzy płacami skroniowymi (AR) oraz objętości lewego ($p=0,6095$) i prawego płata skroniowego ($p=0,3395$) między grupami A, B i C. W trakcie wzrokowej analizy badania MRI 26/31 psów wykazało widoczną asymetrię komór bocznych w badaniu, z czego 19/26 wykazało większą komorę lewą, a 7/26 większą komorę prawą. Dodatkowo utworzono tutaj podgrupy 1,2 i 3 wg zmian radiologicznych w zakresie układu komorowego: grupa 1 – lewa komora większa od prawej ($L>R$), grupa 2 – prawa komora większa od lewej ($L<R$), grupa 3 – komory boczne symetryczne. Analiza wykazała istotną statystycznie różnicę w AR pomiędzy grupami 2 i 3 ($p=0,047202$). Nie wykazano istotnych różnic statystycznych pomiędzy pozostałymi grupami. Uzyskane wyniki oraz ich interpretacja stanowią oryginalny i niezwykle wartościowy wkład w rozwój epileptologii weterynaryjnej.

W rozdziale Dyskusja Autorka komentując uzyskane wyniki badań przeprowadza ich wnikliwą analizę i co warte podkreślenia czyni to sposób

krytyczny, wykazując przy tym umiejętność interpretacji i dojrzałość badacza. Porównując wyniki swoich badań z rezultatami innych Autorów, głównie z medycyny człowieka, ponieważ temat podjęty w dysertacji ma charakter pionierski w weterynarii, wskazuje na podobieństwa zmian patologicznych u psów badanych do ludzi z padaczką skroniową. Doktorantka wymienia również ograniczenia badań własnych polegających na małej liczebności grup oraz braku wyników badań histopatologicznych, które uwidocznilyby być może inne zmiany mikrostrukturalne jak chociażby dysgenezę korową. Trafny wybór cytowanych pozycji piśmiennictwa świadczy o bardzo dobrym opanowaniu przez lek. wet. Pauliny Drobot zagadnień związanych z epileptologią.

Z obowiązku Recenzenta chciałbym zwrócić uwagę, że w prezentowanej rozprawie doktorskiej mogłyby być podane informacje na temat leczenia jakiemu byli poddani pacjenci z grupy badanej psów i czy obserwowano u nich lekooporność, zwłaszcza u zwierząt z asymetrią płątów skroniowych. Byłyby to cenne dane w kontekście podobieństw do padaczki skroniowej u ludzi, która często jest oporna na leczenie farmakologiczne i stanowi to wskazanie do zabiegu chirurgicznego.

Druga moja uwaga dotyczy streszczenia zamieszczonego w manuskrypcie. Moim zdaniem nie spełnia ona wymogów stawianych streszczeniu, które powinno zwięźle przedstawić treść pracy i być zrozumiałe bez konieczności zapoznania się z pełnym tekstem. Czytelnik często wstępnie zapoznaje się z pracą tylko na podstawie streszczenia. Tekst prezentowany przez Doktorantkę stanowi głównie wprowadzenie do podjętego tematu badań, nie zawiera informacji dotyczących liczby zwierząt, konkretnych danych metodycznych oraz co stwierdzono i co z tego wynika. Dlatego proponuję przeredagowanie i skrócenie tekstu według układu: bardzo krótki wstęp, cele, materiał badany (z liczbą

zwierząt) oraz zastosowane metody, wyniki, wnioski i znaczenie kliniczne. Myślę, że ułatwi to przygotowanie rozprawy do publikacji.

Przedstawione przeze mnie uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji, która została zaplanowana, wykonana i przedstawiona poprawnie.

Cztery wnioski kończące pracę stanowią oryginalne osiągnięcia Autorki. Zostały one sformułowane w sposób zwięzły i w pełni znajdują uzasadnienie merytoryczne w uzyskanych wynikach badań.

Lek. wet. Paulina Drobot stwierdza, że:

1. U psów z podejrzeniem padaczki idiopatycznej dochodzi do zmian objętości układu komorowego oraz stosunku objętości komór bocznych do mózgu, bez zmian objętości mózgu w porównaniu do grupy kontrolnej. Otrzymane wyniki wskazują na zmiany strukturalne w zakresie tkanki mózgowej, które nie są stwierdzane w standardowej diagnostyce MRI.
2. Opracowano półautomatyczną metodę wolumetrii mózgu, która umożliwi dokładniejszą oceną objętościową poszczególnych struktur mózgu, co w przyszłości może ułatwić diagnostykę padaczki u psów.
3. Mimo braku istotnych statystycznie różnic, wstępna analiza wolumetryczna płatów skroniowych wskazuje na obecność różnic w objętości pomiędzy płatami u psów z padaczką idiopatyczną. Natomiast w celu uzyskania wiarygodniejszych wyników, wymaga ona zwiększenia liczebności badanej grupy.
4. Istnieje związek pomiędzy obecnością wyładowań w badaniu EEG, a zmniejszeniem objętości płata skroniowego po tej samej stronie co może odpowiadać cechom padaczki przyśrodkowego płata skroniowego u ludzi (mTLE) lub zmianom ponapadowym.

W podsumowaniu chcę wyrazić opinię, że oceniana rozprawa ma bardzo dużą wartość zarówno poznawczą jak i aplikacyjną oraz wprowadza nowe elementy w rozwój neurologii weterynaryjnej.

W konkluzji stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r.

Przedkładam więc Radzie Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie jej Autorki lek. wet. Pauliny Drobot do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



KIEROWNIK KATEDRY
CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH Z KLINIKĄ

prof. dr hab. Andrzej Pomianowski