

30 listopada, 2020

Opinia o pracy doktorskiej Pana mgr. Michała Goneta

Praca doktorska zatytułowana “OBRAZOWANIE METODĄ ELEKTRONOWEGO REZONANSU PARAMAGNETYCZNEGO *IN VIVO* W BADANIACH NOWOTWORÓW KOREJESTROWANE Z INNYMI TECHNIKAMI OBRAZUJĄCYMI” opisuje wykorzystanie metody wyższych harmonicznych sygnału EPR do otrzymania obrazów myszy w warunkach anestezji oraz uzupełnienie obrazowania EPR o obrazy anatomiczne otrzymane przy pomocy techniki ultradźwięków (USG). Praca zawiera szczegółowy opis konstrukcji i działania zaprojektowanej aparatury, łącznie z oprogramowaniem oraz opis przeprowadzonych badań ukazujących praktyczne zastosowanie skonstruowanego urządzenia do badania nowotworów w modelu zwierzęcym.

Praca została wykonana pod kierownictwem dr hab. Martyny Elas, w Zakładzie Biofizyki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Praca zawiera 145 stron, obejmujących, obok streszczenia, cztery główne rozdziały plus dodatki i zawiera 48 rysunków i 11 tabel. Załączniki zawierają kody źródłowe napisanych w MATLAB-ie programów do rekonstrukcji i wizualizacji obrazów EPR. Autor odnosi się do 205 pozycji bibliograficznych. Doktorant jest pierwszym autorem dwóch cytowanych prac.

Rozdział pierwszy zawiera obszerne podstawy teoretyczne obrazowania EPR falą ciągłą (CW EPR) oraz problemy związane z obrazowaniem *in vivo* przy pomocy tej techniki. Kolejny rozdział opisuje opracowane przez doktoranta oprogramowanie służące do rekonstrukcji wielowymiarowych obrazów EPR, łącznie z symulacjami i weryfikacjami algorytmów oraz opisem stworzonego interfejsu graficznego. Oprogramowanie to pozwala na optymalizację rekonstrukcji obrazu poprzez dobór odpowiednich parametrów rekonstrukcji. Następnie doktorant opisuje wyniki obrazowania EPR fantomów i zwierząt. W szczególności, zastosowanie analizy wyższych harmonicznych sygnału EPR umożliwiło znaczne polepszenie stosunku sygnału do szumu (SNR) i w konsekwencji umożliwiło szybkie trójwymiarowe obrazowanie EPR myszy. Praca opisuje również korejestrację obrazów 3D i 4D EPR z obrazami USG. Ostatni, czwarty rozdział to podsumowanie wyników oraz proponowane dalsze kierunki badań w dziedzinie obrazowania EPR.

Zjawisko rezonansu paramagnetycznego znane jest już od prawie 80 lat. Mimo tego obrazowanie przy pomocy tej metody, szczególnie w warunkach *in vivo*, wciąż wymaga udoskonalenia. Trudności w obrazowaniu EPR związane są z samym zjawiskiem rezonansu jak i ze skomplikowaną konstrukcją aparatury. Częstości stosowane w EPR (rzędu GHz), odpowiadające mikrofalom, uniemożliwiają użycie standardowych cewek oraz przewodów radiowej częstości (RF) jak to ma miejsce w przypadku MRI. Konieczne jest zastosowanie falowodów oraz rezonatorów. Problemem są też bardzo krótkie czasy relaksacji i związana z tym konieczność stosowania techniki fali ciągłej w przeciwieństwie do znacznie prościej technicznie metody impulsowej stosowanej w obrazowaniu rezonansowym (MRI). Co więcej, metoda EPR nie dostarcza obrazów anatomicznych ale informacje o substancjach zawierających niesparowany elektron. Mimo tego, spektroskopia EPR stała się bardzo przydatnym narzędziem do badań układów biologicznych, np. do pomiaru zawartości tlenu albo odczynu pH, co ma konsekwencje w diagnostyce np. chorób układu krwionośnego czy też nowotworów. Jednakże, mimo olbrzymiego potencjału tej techniki, obrazowanie EPR *in vivo* wciąż pozostaje na wstępnym etapie opracowywania aparatury i techniki. Badania EPR *in vivo* niosą ze sobą dalsze komplikacje związane z ruchami zwierząt i niskim stosunkiem sygnału do szumu. Największym wyzwaniem jest obrazowanie EPR zwierząt w warunkach anestezji, gdyż obok powyższych problemów technicznych dochodzą jeszcze problemy związane z czasem potrzebnym na zebranie sygnału o odpowiedniej amplitudzie w krótkim czasie ograniczonym przez anestezję.

Z powyższej krótkiej analizy obecnego stanu wiedzy i techniki badawczej związanej z EPR wynika potrzeba dalszych badań a stąd bardzo duży wkład naukowy doktoranta w rozwój tej ważnej dziedziny badań.

Praca Pana Goneta była wielokierunkowa i wymagała między innymi znajomości obrazowania i podstaw teoretycznych EPR, jego praktycznych zastosowań, umiejętności programowania, analizy danych, przygotowania i przeprowadzenie eksperymentów na fantomach oraz *in vivo*, przetestowania i udoskonalenia aparatury jak i kreatywności w poszukiwaniu nowych rozwiązań i umiejętności ich zastosowań.

Choć doktorant dokonał w swojej pracy wielu osiągnięć, uważam że dwa największe z nich to opisane w publikacji zastosowanie analizy wieloharmonicznej do obrazowania *in vivo* EPR oraz połączenie EPR z obrazowaniem ultrasonograficznym. Zastosowanie nowego typu obrazowania

pozwoili na otrzymanie znacznie wyzsze SNR niz w standardowej metodzie fali ciaglej. Wykonana aparatura i oprogramowanie umozliwily obrazowanie glowy zywej myszy z widocznym nowotworem oraz kinetyke przeplywu sondy spinowej w guzie dzieki szybkiemu (rzędu sekund) obrazowaniu. Ponadto obrazy EPR zostaly skorelowane z trójwymiarowymi obrazami USG przy pomocy programu ArbuzGUI, co dokladnie i jasno jest opisane w podrozdziale 2.2.

Wyniki prac Pana Goneta zostaly opublikowane w czasopiśmie *Free Radical Biology and Medicine* o wysokim tzw. „impact faktorze” 6.1, a dodatkowo opracowana metoda zostala zaimplementowana na komercyjnym tomografie skonstruowanym przez firme Novilet. Praca doktorska zwiera w związku z tym bardzo dokladny opis oprogramowania, który jest w zasadzie instrukcja obslugi oprogramowania. Opisane sa tez szczegolowo testy oprogramowania i eksperymenty niezbedne do oceny i weryfikacji techniki, najpierw na fantomach a potem w warunkach *in vivo*. Wyniki pokazaly, ze zastosowana analiza multiharmoniczna rzeczywiscie pozwala na otrzymanie znacznie lepszych obrazow EPR niz standardowe techniki fali ciaglej.

W podsumowaniu doktorant slusznie zwraca uwage na mozliwe dalsze kierunki badan, w szczegolnosci zastosowanie roznych amplitud i maksimow modulacji, ilosci harmonicznnych oraz poszerzenie widma wskutek modulacji i gradientu pola. Uwagi te sluzą dalszemu udoskonaleniu zaproponowanej metody.

Jak zaznaczylem powyzej praca ma wyjatkowo duza wartosc naukowa i praktyczna. Mam jednak kilka krytycznych uwag:

1. Dosć trudno sie zorientowac, szczegolnie w poczatkowej czesci pracy, co doktorant zrobil sam a co zostalo zrobione przez innych, np.: na str 78 doktorant pisze: „Dotychczas wykonane symulacje i optymalizacje prowadzone byly dla fantomow”; na str 80: „Uzyskane dotychczas wyniki” itd. Nie wiadomo kto wykonal te badania i kiedy.

2. We wstepie doktorant pisze o nagrodzie Nobla dla Dra Paula Lauterbura ale nie wspomnial o Dr. Mansfieldzie, który otrzymal te nagrode wspolnie z Dr. Lauterburem. Warto pamietac, ze Sir Peter Manfield po raz pierwszy przedstawil metode obrazowania rezonansem magnetycznym w Krakowie w czasie Colloquim Ampere w roku 1973 o czym wspomnial w czasie uroczystosci nadania mu nagrody Nobla.

3. Wstęp jest obszerny i obejmuje 50 stron. Zawiera on dość podstawowe informacje nt EPR ale brak jest opisu podstaw działania USG, który byłby przydatny w dalszej części pracy oraz w uzasadnieniu wyboru tej metody obrazowania. Dużo miejsca we wstępie zajmują podstawy obrazowania opierające się na projekcji wstecznej ale brak jest głębszego wytłumaczenia technik impulsowych, „rapid scan” oraz efektów modulacji pola magnetycznego, a to byłoby pożądane przy wprowadzeniu do techniki analizy multiharmonicznej oraz wykonanych eksperymentów.

4. Brak jest analizy problemu różnicy rozdzielczości EPR i USG i jego konsekwencji w korejstracji, szczególnie w trzech wymiarach.

5. Brak precyzyjnego wytłumaczenia (na stronie 93) co znaczy, że obrazy USG ze względu na słaby kontrast oraz obecność tła muszą być analizowane *ręcznie*. Sama metoda korejstracji wydaje się dość skomplikowana, głównie ze względu na wymóg udziału operatora co wprowadza błąd ludzki. Czy jest to niezbędne i dlaczego?

6. We wnioskach doktorant zauważa, że zastosowanie analizy multiharmonicznej do detekcji sygnału EPR pozwala na około 40-krotne polepszenie stosunku do szumu projekcji. Niestety nie widzę wytłumaczenia skąd bierze się 40-krotny wzrost SNR.

7. Mam wrażenie, że w całej pracy pojęcie woksela jest niepoprawnie mieszane z pojęciem piksela, np. na rysunku 3.2.1 oraz na stronach 112 do 119.

8. Na stronie 130 doktorant pisze, że otrzymanie obrazu MRI i KT wymaga czasu rzędu kilku minut. Jest to nieścisłe, ponieważ obecnie obrazy KT można otrzymać w kilka sekund a MRI w kilkadziesiąt sekund.

Inne drobne uwagi:

1. W tabeli 1.1 (str. 17) warto byłoby wspomnieć o tlenkach żelaza jako endogennych środkach kontrastowych w MRI.

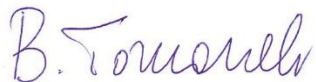
2. Rys 1.13 na str 41: dobrze byłoby pokazać jak obraz wygląda bez filtrowania, dla porównania np. kopiując 2 obrazki z rys. 1.10

3. Niestety brak jest zdjęcia głowicy USG, jest tylko schematycznie zaznaczona na rys 3.3.1.
4. Tabela 1.2 (str 50) przedstawia głębokość penetracji fali dla różnych częstości. Wydaje mi się, że ta tabela wymaga wytłumaczenia związku częstości z możliwościami obrazowania, ponieważ w przedstawionej formie tabelka może sugerować, że np. obrazowanie głowy człowieka przy częstości 100 MHz nie jest możliwe, co nie jest prawdą bo otrzymuje się obrazy rezonansowe głowy człowieka w polu 3T (~128MHz) a nawet 7T.
5. Na stronie 51 doktorant pisze, że „intensywność sygnału EPR jest proporcjonalna do iloczynu współczynnika wypełnienia η i dobroci rezonatora Q „. Niestety zależność ta jest bardziej skomplikowana, gdyż sygnał zależy od różnicy pomiędzy Q dla cewki załadowanej (Q loaded) i cewki pustej (Q unloaded). W publikacji, na którą powołuje się doktorant (publikacja 115) jest Q loaded), co też jest nieściśle, bo np. cewka z wysokim Q unloaded i takim samym Q loaded nie będzie działać.
6. Praca zawiera dość dużo literówek, np: strona 87: Korejstracją - ma byc korejstracja, strona 90: jest kompatybilne ma być kompatybilny; strona 105 ma być: uniemożliwił a nie „nie uniemożliwił”. To są tylko przykłady, takich błędów jest więcej.
7. Na stronie 100 jest niezrozumiałe zdanie: „Następnie n -ta harmoniczna sygnału EPR w domenie Fouriera $Hn(u)$, będąca iloczynem w domenie Fouriera, funkcji filtra $Cn(u)$ oraz transformaty Fouriera pierwszej pochodnej sygnału EPR $P(u)$, co opisuje poniższe równanie”. Zdanie to można prościej i poprawniej napisać.
8. Na ważnym dla całości pracy rys 2.17 (strona 92), który jest pierwszym opisem korejstracji obrazów EPR i USG, dla jasności dobrze byłoby oznaczyć obrazki A,B,C. W obecnej formie trudno się zorientować ile było rurek (3 czy 4?); w jakich przekrojach; które obrazki są obrazami EPR a które USG? Rysunek odnosi się do tytułu pracy doktorskiej stąd wymaga więcej szczegółów.

Jak zaznaczyłem, opracowanie i zastosowanie obrazowania EPR z użyciem analizy multiharmonicznej EPR oraz korelacja obrazów EPR z obrazami USG i w końcowym etapie

obrazowanie *in vivo* wymagają dużej wiedzy teoretycznej oraz praktycznych umiejętności w programowaniu, przygotowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów. Pan mgr Gonet starannie rozważył wszystkie te czynniki, pokazując głęboką wiedzę teoretyczną tematu jak i umiejętności praktyczne. Doktorant podszedł do problemu w sposób metodyczny, który pozwolił mu na osiągnięcie założonego celu badawczego. Zaproponowana technika powinna w przyszłości pozwolić na szersze zastosowanie metody w warunkach laboratoryjnych a może i klinicznych do wczesnej diagnostyki nowotworów oraz innych schorzeń układu krwionośnego i nerwowego.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona praca spełnia wymogi pracy doktorskiej i wnoszę o dopuszczenie Pana Michała Goneta do dalszego etapu obrony pracy. Uwzględniając tematykę i wkład doktoranta w rozwój obrazowania EPR proponuję też wyróżnienie pracy.

A handwritten signature in blue ink, reading "B. Tomanek". The signature is written in a cursive, flowing style.

Prof. dr hab. Bogusław Tomanek