

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Karola Kołodziejskiego pt.
„Markery zmian patologicznych w tkankach na podstawie relaksacji
Magnetycznego Rezonansu Jądrowego w niskim polu”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w formule cyklu publikacji i opiera się na trzech artykułach naukowych, których Pan mgr inż. Karol Kołodziejski jest pierwszym autorem. Do rozprawy dołączono oświadczenia wszystkich współautorów wskazanych prac. Z treści tych oświadczeń wynika, że Pan mgr inż. Karol Kołodziejski był głównym autorem publikacji stanowiących treść rozprawy, a jego wkład obejmował kluczowe elementy procesu badawczego (w szczególności koncepcję i realizację badań oraz opracowanie wyników).

Rozdział wstępu w czytelny sposób przybliża problematykę badawczą, porządkuje kontekst zastosowania relaksometrii NMR/FFC w badaniach tkanek oraz wprowadza podstawowe pojęcia potrzebne do zrozumienia dalszych rozdziałów. Dzięki temu część ta stanowi dobre „wejście” dla czytelnika, który nie musi być specjalistą w relaksometrii niskopolewej.

Jednocześnie, przy tak silnie metodycznej i modelowej pracy, można rozważyć lekkie „dociążenie” wstępu elementami bardziej technicznymi – nie po to, by zmieniać jego przystępny charakter, ale by mocniej zakotwiczyć dalszą analizę w jasno opisanych przesłankach fizycznych. Dotyczy to zwłaszcza uzasadnienia wyboru parametryzacji opartej na sumie trzech składowych o charakterze lorentzowskim (w praktyce: kilku procesów relaksacyjnych o różnych czasach korelacji). W rozprawie pojawia się argument, że szeroki zakres częstotliwości/pól (obejmujący kilka rzędów wielkości) „wymusza” wieloskładnikowy opis, co jest intuicyjnie trafne, jednak warto byłoby rozwinąć ten fragment o krótkie dopowiedzenie: jakie obserwacje w danych (np. kształt dyspersji) sugerują istnienie więcej niż jednego procesu oraz jaką interpretację fizykochemiczną autor przypisuje poszczególnym składowym (np. woda bardziej swobodna vs woda związana z makrocząsteczkami, wkład środowiska białkowego/lipidowego, efekty wymiany).

Dobrym uzupełnieniem byłoby także syntetyczne porównanie proponowanego modelu z podejściami częściej spotykanymi w literaturze relaksacyjnej, zwłaszcza w obszarze badań roztworów białek i układów biologicznych. Czytelnik skorzystałby z krótkiego „mapowania”: w jakim sensie zastosowany opis jest odpowiednikiem klasycznych modeli opartych o gęstości widmowe i pojedynczy czas korelacji, a w

jakim stanowi ich uogólnienie (np. jako suma kilku procesów reprezentujących rozkład czasów korelacji). Taki krótki przegląd porównawczy nie tylko wzmocniłby uzasadnienie wyboru modelu w tej rozprawie, ale także ułatwiłby interpretację uzyskanych parametrów w kategoriach mechanizmów fizykochemicznych, na czym rozprawa mogłaby dodatkowo zyskać.

W tekście rozprawy pojawia się również kilka drobnych nieścisłości redakcyjno-terminologicznych, które nie wpływają na ogólną wartość merytoryczną pracy, ale warto je dopracować. Przykładowo, sformułowanie: „*Analiza wieloskładnikowa ujawniła, że w próbkach nowotworowych procesy relaksacyjne charakteryzują się dłuższymi czasami korelacji oraz mniejszymi amplitudami sygnału*” może być odbierane jako niejednoznaczne. W kontekście NMR termin „sygnał” zwykle odnosi się do rejestrowanego sygnału indukowanego w cewce odbiorczej (FID/echo), natomiast w omawianym zdaniu najprawdopodobniej chodzi o amplitudy składowych relaksacyjnych (udziały/parametry amplitudowe komponentów w dopasowaniu modelu). Dodatkowo, dla spójności terminologicznej dobrze byłoby ujednolicić nazewnictwo związane z osią częstości/częstotliwości: w polskiej części rozprawy pojawiają się zamiennie określenia „częstość” i „częstotliwość”, podczas gdy na wykresach stosowana jest skala w Hz. Dla czytelności i pełnej jednoznaczności (zwłaszcza w kontekście NMR, gdzie w równaniach często występuje ω w rad/s) zasadne byłoby konsekwentne używanie „częstotliwości” dla f [Hz] oraz „częstości kołowej” dla ω [rad/s], z jawnym przypomnieniem relacji $\omega = 2\pi f$. Warto również rozważyć drobną korektę sformułowań w opisach relaksacji T_2 , gdzie pojawia się określenie „wygaszenie magnetyzacji”. W NMR precyzyjniej jest podkreślić, że dla T_2 chodzi o zanik składowej poprzecznej magnetyzacji wskutek dekoherencji/de-fazowania (a w pomiarze – o spadek amplitudy sygnału echa/FID), podczas gdy magnetyzacja w sensie równowagowym nie „zanika”, tylko zmienia się rozkład faz spinów.

Przechodząc do wartości naukowej pracy, autor jasno i jednoznacznie określa cel rozprawy, formułując go w trzech komplementarnych aspektach. Po pierwsze, celem pracy jest zbadanie dynamiki wody oraz frakcji makromolekularnej w tkankach zmienionych i niezmienionych patologicznie z wykorzystaniem pomiarów relaksacyjnych prowadzonych w zmiennych, niskich polach magnetycznych. Po drugie, autor zakłada opracowanie metodologii analizy danych, ukierunkowanej na wyodrębnianie parametrów („markerów”) potencjalnie związanych ze zmianami patologicznymi. Po trzecie, finalnym celem jest identyfikacja takich markerów w badanych tkankach, tj. wskazanie wielkości ilościowych pozwalających różnicować materiał patologiczny i referencyjny oraz opisywać charakter tych różnic.

Do realizacji powyższych celów autor wykorzystuje technikę *Fast Field Cycling* (FFC), tj. pomiary szybkości relaksacji w funkcji zewnętrznego pola magnetycznego

B_0 . FFC stanowi unikatowe narzędzie badawcze, ponieważ umożliwia analizę wpływu ruchów molekularnych (w szczególności dynamiki wody oraz oddziaływań z frakcją makromolekularną) na relaksację spinów jąder w badanych próbkach. W odróżnieniu od klasycznych pomiarów relaksacyjnych wykonywanych *in vivo* i *ex vivo* najczęściej w jednym, stałym polu (wynikającym z ograniczeń sprzętowych współczesnych skanerów medycznych), podejście FFC pozwala śledzić zależność parametrów relaksacyjnych od pola, a tym samym wnioskować o mechanizmach fizykochemicznych leżących u podstaw obserwowanych różnic tkankowych. Interpretacja czasu relaksacji ocenianego wyłącznie dla jednej wartości pola ma ograniczoną wartość diagnostyczną – pozostaje silnie zależna m.in. od zastosowanej sekwencji pomiarowej i w praktyce wymaga ścisłego powiązania z innymi danymi klinicznymi i histopatologicznymi. Zastosowanie FFC rozszerza ten obraz, umożliwiając bardziej pogłębioną charakterystykę badanych tkanek poprzez analizę ich „widm relaksacyjnych” w funkcji pola. W tym kontekście słusznie podkreślono we wstępie, że pomimo istnienia szeregu prac wykorzystujących FFC, dostępne dane literaturowe dotyczące tkanek biologicznych – zwłaszcza w ujęciu porównawczym tkanek patologicznych i referencyjnych – pozostają stosunkowo niewielkie. Postawione cele badawcze należy zatem ocenić jako trafnie sformułowane i odpowiadające na realną lukę w aktualnym stanie wiedzy, a także istotne z punktu widzenia rozwoju metod ilościowej oceny własności tkanek.

W pierwszej pracy pt. „*Markers of low field NMR relaxation features of tissues*” autor realizuje pierwszy etap opracowania metodologii analizy danych, proponując ilościowe markery umożliwiające porównywanie profili relaksacji R_1 w funkcji pola/częstotliwości dla tkanek patologicznych i referencyjnych oraz wstępnie walidując je na materiale dotyczącym nowotworów jelita grubego. W analizie wstępnej autor koncentruje się na uchwyceniu podstawowych różnic między grupami bez stosowania złożonych modeli, po przeskalowaniu danych tak, aby zapewnić pokrycie w zakresie wysokich częstotliwości, wskazuje, że najbardziej wyraźne różnice ujawniają się w obszarze niskich częstości. W celu ilościowego opisu tych różnic autor wprowadza parametr ξ , zdefiniowany jako względna zmiana R_1 pomiędzy $\nu_1 = 1$ kHz i $\nu_2 = 10$ kHz. Parametr ten różnicuje badane tkanki: dla próbek patologicznych ξ wynosi 14–23%, natomiast dla referencyjnych 28–42%, co autor traktuje jako potencjalny marker zmian patologicznych. Następnie wykonuje parametryzację krzywych $R_1(\omega)$ z użyciem modelu wieloskładnikowego (proces wolny, pośredni, szybki oraz składnik bardzo szybkiej dynamiki), wskazując, że najbardziej istotne różnice dotyczą wolnej dynamiki molekularnej: C_s jest około pięciokrotnie większy, a τ_s około czterokrotnie mniejszy w tkance patologicznej niż w referencyjnej. Uzupełniając analizuje pochodne dopasowanych krzywych i krzywe wzorcowe, wykazując różnice amplitudy (stosunek ok. 0,44) oraz przesunięcie minimum (5,4 kHz vs 1,8 kHz), a także obserwuje maksimum ilorazu

R_1 (patologia/referencja) w zakresie 5–50 kHz. Zaproponowane w tej pracy podejście analityczne stanowi punkt wyjścia dla całej rozprawy i jest następnie konsekwentnie stosowane oraz rozwijane w dwóch kolejnych publikacjach wchodzących w skład cyklu.

W drugiej pracy pt. „*Revealing and modelling NMR relaxation processes in tissues: endometrial cancer tissue as an example*” autor przenosi wcześniej zaproponowaną sekwencję analiz na tkanki raka endometrium i jednocześnie ją rozszerza. Pierwszym krokiem jest normalizacja danych względem wartości szybkości relaksacji w wysokim polu magnetycznym, co pozwala wyraźniej uwidocznić różnice w obszarze niskich pól, a następnie – analogicznie jak w pracy pierwszej – ilościowy opis tych różnic przy pomocy parametru ξ . Dla tkanek endometrium ξ przyjmuje wartości 42–62%, ze średnią ok. 54% i odchyleniem standardowym 5%, co wskazuje na istotny spadek R_1 w zakresie niskich częstotliwości. Kluczowym rozszerzeniem jest zastosowanie modelu potęgowego $R_1(\omega) = C\omega^{-\alpha}$, który umożliwia sprowadzenie nachylenia dyspersji relaksacyjnej do jednego parametru α . Równolegle analiza przebiegów czasowych magnetyzacji pokazuje, że relaksacja podłużna T_1 ma charakter monoeksponencjalny (zarówno w FFC, jak i przy pojedynczej częstotliwości 18,7 MHz), natomiast relaksacja poprzeczna T_2 jest wyraźnie dwueksponencjalna, co interpretowane jest jako obecność co najmniej dwóch populacji protonów. Z dopasowań T_2 wyznaczono składowe $R_{2,fast}$ i $R_{2,slow}$ o średnich wartościach odpowiednio ok. $20 \pm 9 \text{ s}^{-1}$ oraz $7 \pm 3 \text{ s}^{-1}$, przy typowym stosunku 2–4 (z pojedynczym odstępstwem). Autor zwraca też uwagę, że choć stosunek amplitud składowych jest zmienny, tylko w pięciu zestawach danych amplituda komponentu szybkiego przewyższa wolną, co sugeruje częstą dominację wkładu wolniejszej składowej w zanik magnetyzacji poprzecznej.

W trzeciej pracy pt. „ *^1H NMR relaxation processes in lung tissues at low magnetic fields*” autor wykorzystuje i weryfikuje na materiale nowotworów płuc podejście analityczne opracowane w dwóch wcześniejszych publikacjach cyklu. Analizę rozpoczyna od przeskalowania danych w celu uzyskania zgodności w zakresie wysokich pól, co umożliwia bezpośrednie porównanie dyspersji R_1 , a następnie ilościowo opisuje różnice w niskich częstotliwościach za pomocą parametru ξ wyznaczanego w oknie 10–100 kHz. Uzyskane wartości ξ są zbliżone dla tkanek patologicznych i referencyjnych, co sugeruje, że w przypadku płuc sama miara spadku R_1 w tym zakresie częstotliwości ma ograniczoną moc różnicującą. W kolejnym kroku autor stosuje model potęgowy $R_1(\omega) = C\omega^{-\alpha}$ i wyznacza wykładnik α , uzyskując wartości bardzo podobne dla obu grup, przy dobrych dopasowaniach. Dodatkowo analizuje iloraz $(R_1^{ref})/(R_1^{tum})$ w szerokim zakresie częstotliwości, wskazując, że w większości przypadków tkanki referencyjne relaksują szybciej (mają wyższe R_1) niż odpowiadające im tkanki nowotworowe, z pojedynczym wyraźnym odstępstwem dotyczącym jednego przypadku histopatologicznego. Średni iloraz

jest w przybliżeniu stały w funkcji częstotliwości, z zauważalnym odchyleniem w zakresie, gdzie ujawniają się efekty QRE. Uzupełnieniem pomiarów T_1 są eksperymenty T_2 przy 18,7 MHz, w których we wszystkich próbkach obserwowany jest dwu-eksponencjalny charakter relaksacji poprzecznej, interpretowany jako obecność co najmniej dwóch składowych związanych z odmienną dynamiką protonów/wody. Autor wskazuje, że składowa wolniejsza może być wiązana z frakcją wody silniej oddziałującą z makrocząsteczkami, a ponadto amplituda komponentu szybkiego jest zasadniczo mniejsza niż komponentu wolnego, choć z istotnym rozrzutem między próbkami.

Trzy publikacje wchodzące w skład cyklu tworzą spójny materiał badawczy, a autor prowadzi narrację w sposób konsekwentny: kolejne etapy analizy są jasno zarysowane, wyniki przedstawiono na licznych wykresach, a ich interpretacja jest logiczna i zazwyczaj dobrze umotywowana. Na uwagę zasługuje także to, że dyskusja jest prowadzona w odniesieniu do wcześniejszych rezultatów autora, co porządkuje tok rozumowania i ułatwia śledzenie, jak proponowane markery i modele są rozwijane między pracami.

Jednocześnie po lekturze pozostaje pewien „niedosyt” wynikający przede wszystkim z ograniczonej próby powiązania obserwowanych zmian w profilach relaksacyjnych z konkretnymi mechanizmami fizykochemicznymi – zwłaszcza w tkankach zmienionych chorobowo. Owszem, w pracy nr 2 pojawia się bardziej rozbudowany wątek interpretacyjny, w którym wykładnik α z modelu potęgowego zestawiany jest z zachowaniem układów modelowych (np. polimerów) i związkami między charakterem ruchu molekularnego a wartością α . Jednak w całym cyklu brakuje dodatkowych, niezależnych danych (poza rozpoznaniem klinicznym próbek nowotworowych oraz – w raku płuca – wartościami SUV z badań PET), które mogłyby wesprzeć wnioskowanie o źródłach różnic relaksacyjnych. Skoro dominujące zmiany dotyczą parametrów związanych z wolniejszą dynamiką molekularną, zasadne byłoby wyraźniejsze omówienie, czy są one jedynie konsekwencją przebudowy architektury tkanki, zmian składu (woda związana, makrocząsteczki, lipidy) i mikrośrodowiska, czy też mogą odzwierciedlać bardziej specyficzne procesy patofizjologiczne. W tym miejscu komentarz autora – choćby w formie hipotez i ograniczeń – byłby szczególnie pożądany.

Drugim, nieco niedocenionym aspektem jest preparatyka próbek. W zależności od badanego nowotworu materiał był analizowany w różnych reżimach: bezpośrednio po pobraniu, po zamrożeniu, a także po utrwaleniu (np. w formalinie) i/lub w postaci blozków parafinowych, co może znacząco wpływać na stan wody, białek i mikrostrukturę tkanki (zwłaszcza przy utrwalaniu i odwadnianiu). Z pozoru jest to potencjalne źródło niejednorodności i czynnik utrudniający porównania międzygrupowe, ale jednocześnie można to potraktować jako istotny atut cyklu:

pomimo odmiennych procedur przygotowania materiału autor potrafi w każdej z badanych grup zidentyfikować ilościowe cechy profili relaksacyjnych różnicujące tkankę nowotworową od kontrolnej. Może to świadczyć o wysokiej czułości relaksometrii FFC na zmiany patologiczne. Szkoda, że w samej rozprawie kwestia ta nie została wyraźniej podniesiona i przedyskutowana, ponieważ mogłaby dodatkowo wzmocnić interpretację wyników oraz lepiej uzasadnić ich porównywalność i potencjalną wartość aplikacyjną.

Podsumowując uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska jest pracą wartościową. Obejmuje obszerny materiał badawczy, który został opublikowany w specjalistycznych czasopismach naukowych. Należy podkreślić, że poza trzema publikacjami stanowiącymi podstawę rozprawy Pan mgr inż. Karol Kołodziejski jest również współautorem pięciu innych prac. Autor wykazuje ponadto znaczące zaangażowanie w działalność naukową: był uczestnikiem dwóch szkoleń, brał udział w dwóch konferencjach oraz odbył sześć staży badawczych, co świadczy o aktywnym uczestnictwie w tzw. „życiu naukowym” i konsekwentnym rozwoju kompetencji badawczych.

Rozprawa zawiera wymagane elementy nowości naukowej, potwierdzone wynikami naukowymi wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej, i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i określone w ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.), jak również zwyczajowe standardy stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pana mgr inż. Karola Kołodziejskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

G. Kusz