

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, 08.12.2025

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Wasilewskiej pt. „Functional Magnetic Resonance Spectroscopy (fMRS) Study on Reading-Related Metabolite Changes”

wykonanej w Pracowni Neurobiologii Procesów Językowych Instytutu Biologii  
Doświadczalnej PAN im M. Nenckiego w Warszawie

pod kierunkiem promotor profesor dr hab. Katarzyny Jednoróg

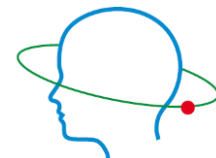
oraz promotora pomocniczego dr Bartosza Kossowskiego

W przedstawionej mi do recenzji pracy, podjęty został temat potencjalnego związku mózgowych mechanizmów dysleksji z hipotezą szumu neuronalnego, która sugeruje, że dysleksja może być spowodowana zaburzeniem równowagi między glutaminianem (Glu) a kwasem gamma-aminomastwowym (GABA) w strukturach związanych z umiejętnością czytania. W szczególności zakłada ona że zwiększone stężenie glutaminianu w lewym górnym zakręcie skroniowym (STS) zakłóca przetwarzanie sygnałów i utrudnia nabywanie umiejętności czytania. Propozycją Autorki jest weryfikacja wspomnianej hipotezy poprzez badania z wykorzystaniem funkcjonalnej spektroskopii rezonansu magnetycznego (fMRS). Funkcjonalna spektroskopia rezonansu magnetycznego (1H-fMRS) to technika obrazowania, która umożliwia nieinwazyjny pomiar stężeń metabolitów mózgowych in vivo - w tym kluczowych neuroprzekazników, takich jak glutaminian i kwas gamma-aminomastwowy. W odróżnieniu od klasycznego fMRI opartego na sygnale BOLD (zależnym od utlenowania krwi), fMRS mierzy bezpośrednio zmiany stężenia metabolitów związanych z aktywnością neuronów.

Warto podkreślić, że jest to technika bardzo wymagająca szczególnie badania spektroskopii wykonane na skanerze 7T, wiążą się z dodatkowymi trudnościami technicznymi. Niewiele jest na świecie badań tego typu wykorzystujących technikę fMRS, po pierwsze ze względu na niewielką dostępność skanerów ultra-wysoko-polowych, które zapewniają znacząco lepszy stosunek sygnału do szumu (w Polsce jest tylko jeden skaner 7T do badań ludzi) ale przede wszystkim dużym wyzwaniem jest uzyskanie wysokiej jednorodności pola magnetycznego w trudnych obszarach anatomicznych (o czym przekonała się Doktorantka badając dolny zakręt skroniowy). Tym bardziej należy docenić walory techniczne niniejszej rozprawy doktorskiej.

Zagadnienia z tego obszaru mają istotne znaczenie w logopedii, pedagogice, psychologii i neurobiologii ze względu na podejmowaną przez nie problematykę związaną z umiejętnością pisanie i czytania, w szczególności w przypadku różnego rodzaju zaburzeń komunikacji językowej, nie tylko pisemnej.

Układ pracy jest logiczny a sama praca w języku angielskim napisana jest poprawnym naukowym językiem. Rozprawa doktorska liczy 180 stron, składa się z 5 rozdziałów, z których pierwszy stanowi wprowadzenie teoretyczne, drugi zawiera opis badań własnych i przeprowadzonych analiz, trzeci przedstawia uzyskane wyniki. W ostatnich rozdziałach Autorka



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

zamieściła dyskusję wyników, wnioski, ograniczenia i przyszłe kierunki rozwoju. Pochwalić należy szatę graficzną, starannie przygotowane ilustracje. Duży plus za jakość pracy.

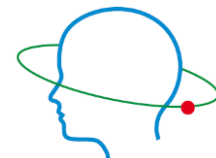
Zakres literatury, podanej przez Autorkę dysertacji jest bardzo szeroki, zawiera 183 pozycje i w pełni odpowiada tematyce podjętych zagadnień. W moim przekonaniu dobór i wykorzystanie źródeł jest prawidłowe. Liczba pozycji bibliograficznych, z czego ponad 1/3 część publikowana jest po 2020 roku, świadczy o dobrej znajomości starszej i najnowszej literatury w tej dziedzinie. Martwi natomiast niewielka ilość krajowych źródeł (12 publikacji) z czego 9 afiliowanych jest z Pracowni Promotorki doktoratu, patrząc w kontekście tego, że badania dotyczą języka polskiego.

#### **Uwagi dotyczące wprowadzenia teoretycznego:**

Doktorantka przedstawiła syntetyczny opis techniki spektroskopii rezonansu magnetycznego pojedynczego woksela, który bardzo dobrze prezentuje najważniejsze informacje o zaletach i wadach wspomnianej techniki. Opisała podstawy fizyczne spektroskopii MR, stosowane sekwencje spektroskopowe, modelowanie widma za pomocą zestawu podstawowego widm metabolitów, oprogramowanie do analizy badań spektroskopowych a w szczególności przedstawiła podstawy funkcjonalnej spektroskopii rezonansu magnetycznego.

W mojej ocenie tej części pracy zabrakło bardziej szczegółowego omówienia cyklu glutaminian-glutamina w neuronach i roli astrocytów. W dużym uproszczeniu astrocyt usuwa glutaminian ze szczeliny (ok 80-90%), neutralizuje go w formie glutaminy, po czym neuron odzyskuje z astrocytu tę glutaminę i przerabia z powrotem na glutaminian. Brakuje mi opisu dynamiki tego procesu, jaka część glutaminianu jest uwalniana podczas stymulacji (z badań wynika, że poniżej 1-5% na pojedynczy impuls), jak szybko astrocyty wychwytyują glutaminian ze szczeliny synaptycznej (milisekundy) i jak szybko zachodzą procesy „odzyskiwania” glutaminianu aby ponownie uzupełnić zapasy w pęcherzykach. Która pula glutaminianu w zdrowym mózgu (np. pęcherzykowa, cytoplazmatyczna czy pozakomórkowa) odpowiada za sygnał w 1H-MRS oraz dlaczego jego stężenie może zmieniać się podczas aktywacji neuronalnej mimo bardzo małego procentu glutaminianu faktycznie uwalnianego do szczeliny synaptycznej. W końcu jakie procesy metaboliczne wpływają na dynamiczną równowagę tej substancji. Jaka to skala czasowa i czy fMRS ma szansę uchwycić taką dynamikę? Czy długotrwała stymulacja (seria impulsów) może „opróżnić” zapasy glutaminianu w pęcherzykach (z badań wynika, że raczej nie) czy jednak neuron utrzymuje stabilne stężenie glutaminianu poprzez wydajne procesy odzyskiwania i uzupełniania glutaminianu? Pęcherzykowa pula glutaminianu to <20% całkowitego Glu i jest magazynowana w formie praktycznie niewidocznej w MRS. Podobnie glutaminian w szczelinie synaptycznej – zmiany są zbyt szybkie i zbyt małe aby mogły być wychwycone przez MRS. Widoczny w MRS jest głównie glutaminian cytoplazmatyczny (80–90% całej mierzonej puli). W wyniku stymulacji neuronalnej dopiero po kilkunastu sekundach intensywnej stymulacji zmienia się stężenie glutaminianu w cytoplazmie, którego produkcja jest proporcjonalna do metabolizmu. Im większa stymulacja neuronu tym większe potrzeby energetyczne, które są między innymi zużywane na wytwarzanie glutaminianu i wtedy może to być widoczne w MRS. fMRS nie mierzy aktywności synaptycznej (ta jest niezauważalna dla spektroskopii), tylko metaboliczną odpowiedź na nią. Zmiany związane z metabolizmem pojawiają się dopiero po 10-20 sekundach i osiągają plateau w 20-60 sekundzie. Są to zmiany bardzo małe (1-5% Glu, 3-10% Glx) i są w miarę stabilne na poziomie minut. Po zakończeniu bodźca zmiany zanikają w 30-120 sekundach. W obszarach językowych najczęściej obserwuje się stabilny poziom Glu, wzrost Gln co przekłada się na umiarkowany wzrost Glx. Odzwierciedla to wyższe tempo cyklu Glu-Gln w astrocytach.

Wynikałoby z tego, że w pomiarach glutaminianu po stymulacji obszarów związanych z czytaniem nie należy się spodziewać zmian stężenia w ciągu kilku kolejnych sekund po stymulacji co



zresztą potwierdziło się w opisanych badaniach. Ewentualne zmiany związane z obciążeniem w wyniku stymulacji wymagałyby raczej bardzo intensywnej stymulacji a następnie pomiarów stężenia glutaminianu rozłożonych w czasie kolejnych 2 min. Można się spodziewać wzrostu Glu po ok 20 sek a następnie stopniowego spadku do wyjściowego poziomu (bez stymulacji) pomiędzy 90-120 sek. Należałoby zatem zmienić schemat pomiarów na blokowy ale o dłuższych okresach i z odpowiednio długim okresem odpoczynku (rest) aby metabolizm komórek nerwowych wrócił do poziomu podstawowego.

Dalsza część wstępu teoretycznego dotyczy dysleksji i hipotez na temat jej przyczyn. Przyczyny dysleksji jak i objawy nie są jednorodne. Dysleksja rozwojowa pozostaje wyzwaniem naukowym i edukacyjnym, jednak dzięki intensywnym badaniom z ostatnich lat coraz lepiej rozumiemy jej mechanizmy. Współczesne hipotezy neurobiologiczne rozszerzyły nasze spojrzenie poza czysto językowe deficyty, ujawniając złożoną sieć powiązań między funkcjami poznawczymi a rozwojem struktur mózgu. Mechanizmy dysleksji obejmują zaburzenia na poziomie przetwarzania dźwięków mowy, percepcji wzrokowej, integracji zmysłów, automatyzacji umiejętności, a nawet subtelne różnice w organizacji sieci neuronalnych i połączeń istoty białej. Żadna z tych perspektyw nie wyklucza pozostałych – przeciwnie, dopiero ich połączenie daje pełniejszy obraz. Badania z lat 2018–2025 szczególnie podkreślają rolę podejścia wieloczynnikowego: dysleksja wynika z nakładania się wielu drobnych deficytów, a profile tych deficytów mogą różnić się między osobami. Przyszłe prace badawcze koncentrują się na zintegrowaniu wiedzy z poziomu genów, neuronów i zachowania, co może zaowocować lepszymi metodami wczesnego wykrywania dysleksji i bardziej spersonalizowanymi interwencjami edukacyjnymi. Dysleksja jest więc realnym, neurobiologicznie uwarunkowanym zaburzeniem, którego zrozumienie wymaga uwzględnienia wielu perspektyw – od fonologii przez neurofizjologię po dynamiczne modele sieci mózgowych. Takie interdyscyplinarne podejście daje nadzieję na skuteczniejsze wspieranie osób z dysleksją w pokonywaniu trudności w czytaniu.

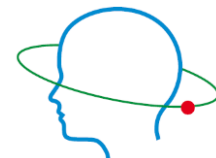
Hipoteza szumu neuronalnego jako czynnika sprzyjającemu powstawaniu dysleksji nie jest obecnie dominującą hipotezą ale kilka lat temu gdy rozpoczął się projekt badawczy w którym wzięła udział Doktorantka ta hipoteza była wciąż brana pod uwagę jako potencjalnie prawdopodobna.

Wybór tematu pracy doktorskiej, uważam za trafny. Poruszone zagadnienie jest istotne nie tylko ze względów naukowych ale również ze względów społecznych. Wstęp teoretyczny przedstawiony w pracy porusza szereg istotnych czynników, które miały wpływ na dobór metod badawczych jak i późniejszej analizy.

#### **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 analizę zgromadzonych danych, a także przeprowadzenie własnych pomiarów i obserwacji, połączonych z umiejętnością posługiwania się nowoczesnymi narzędziami, było trudne do wykonania. Ten ambitny projekt wymagał od Doktorantki dużej wiedzy teoretycznej i praktycznej.

Pierwszym celem realizowanym w ramach pracy było zbadanie czy stężenie glutaminianu zmienia się w obszarze STS i VWFA podczas czytania. Drugim celem było zweryfikowanie hipotezy szumu neuronalnego, która przewiduje wyższe stężenie glutaminianów u osób z dysleksją w obszarze STS. Trzecim celem było sprawdzenie czy podwyższony poziom glutaminianów obejmuje jedynie obszary skroniowe czy też jest efektem uogólnionym i występuje również w regionach nie związanych z czytaniem. Kolejnym celem było poznanie dynamiki zmian stężenia glutaminianów w wyniku



stymulacji neuronalnej. Ostatnim celem było porównanie jakości i czułości skanera 3T i 7T w zastosowaniu do spektroskopii MR.

Należy przyznać, że zaprezentowany ciąg eksperymentów i stawianych hipotez stanowi bardzo interesujący temat rozprawy.

#### **Uwagi dotyczące charakterystyki grupy badanej:**

Liczebność badanych grup jest zazwyczaj wyzwaniem. Z jednej strony powinna być jak największa ze względu na dyskretne zmiany mierzonych parametrów i dążenie do osiągnięcia istotności statystycznej a z drugiej strony należy uwzględnić wysokie koszty badań obrazowych. W badaniach na skanerze 7T wzięło udział 59 osób (w tym 29 osób z dysleksją) a na skanerze 3T wzięło udział 40 osób (w tym 21 osób z dysleksją). Grupy nie różniły się pod kątem wieku osób badanych. Zważywszy na to, że badania spektroskopii MR są bardzo wymagające pod względem technicznym, ostatecznie ilość pomiarów spełniających kryteria jakości była mniejsza. Szczególnym wyzwaniem okazały się pomiary w regionie VWFA ze względu na trudności w uzyskaniu jednorodności pola magnetycznego w tym obszarze, które nie pozwoliły na zebranie wystarczającej ilości dobrej jakości danych i region ten został wyłączony z dalszych analiz.

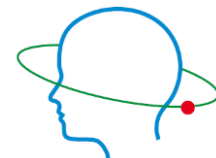
#### **Uwagi dotyczące metody badań:**

Jako badanie pilotowe służące indywidualnemu wyznaczeniu lokalizacji regionów mózgu zaangażowanych w proces czytania zastosowano sekwencję fMRI. Z opisu wynika, że sekwencja ta wykorzystywała schemat blokowy jednakże o ile blok stymulacji miał długość 16.8 sek to blok rest miał jedynie 8 sek co zapewne ograniczyło głębokość modulacji efektu BOLD i mogło się przełożyć na uzyskane wyniki. Prosiłbym o zaprezentowanie kilku przykładów jak wyglądały obszary aktywne (STS, VWFA) i na ile użyta procedura dała powtarzalne wyniki. Z opisu wynika, że zastosowano bardzo niski threshold  $p < 0.01$  uncorrected a w niektórych przypadkach nawet  $p < 0.05$  uncorrected. To bardzo niski próg, który może dać wiele fałszywych wyników. Zastosowano również filtr wygładzający  $\text{FWHM} = 6\text{mm}$ , który stosuje się zwykle w analizach grupowych do niwelowania różnic anatomicznych, w przypadku mapowania w przestrzeni natywnej nie ma potrzeby używania filtru chyba, że chce się uzyskać większy obszar aktywacji.

Pytanie techniczne – czy była stosowana korekcja zniekształceń EPI? Ze względu na użycie Multiband acceleration factor  $\times 3$  można się spodziewać zniekształceń, które mogą wpłynąć na przesunięcie lokalizacji aktywacji względem obrazu strukturalnego.

Jeśli chodzi o procedurę funkcjonalnej spektroskopii fMRS to jak już wspomniałem wcześniej w mojej opinii nie jest ona optymalna do uchwycenia efektu zmiany stężenia glutaminianów w wyniku stymulacji. Zakładana dynamika zmian stężenia glutaminianów jest oparta o komponenty glutaminianów, które nie są wychwytywane przez spektroskopię co może tłumaczyć uzyskane wyniki badań.

Odnosnie opisu konfiguracji skanerów to brakuje mi informacji jaka cewka nadawcza była zastosowana w skanerze GE 7T Discovery 950? O ile się orientuję to skaner ten wyposażony jest w dwie cewki nadawcze 2-kanalową pracującą w trybie CP (kołowo-spolaryzowanej) oraz cewkę 8-kanalową pracującą w trybie pTX. Skaner MR 3T Trio ma jedną cewkę nadawczą do całego ciała (w obudowie magnesu), natomiast skaner 7T nie ma wbudowanej cewki tylko oddzielne cewki nadawcze nakładane na zewnątrz cewki odbiorczej. Stosując cewkę 8-kanalową na 7T skanerze można teoretycznie lepiej kształtować jednorodność pobudzenia RF, jednakże sama korekcja jednorodności pola magnetycznego zależy od cewki shimmingowej wbudowanej w cewkę



gradientową. Zakładając porównywalne możliwości korekcji obu rozwiązań to na skanerze 7T same zniekształcenia pola magnetycznego spowodowane obecnością osoby badanej są znacznie większe, co powoduje, że korekcja większych zniekształceń przy użyciu zbliżonych narzędzi jest większym wyzwaniem. Stąd dość zbliżone jakościowo widma uzyskane na obu skanerach. To co potencjalnie mógłby zyskać skaner 7T ze względu na większą czułość traci przez stosunkowo mało wydajny system shimmingu aktywnego.

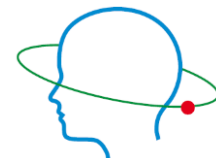
Na stronie 46 wspomniano o korejestracji obrazów strukturalnych z sesji fMRI i sesji z fMRS w celu określenia lokalizacji woksela do pomiarów fMRS. Jak wyglądała dokładnie ta procedura, mam na myśli to, że podczas sesji fMRS zbierany był najpierw obraz strukturalny, potem skanowanie było wstrzymywane na czas wykonania tej korejestracji aby potem uzyskać lokalizację gdzie umieścić wksel w sekwencji spektroskopowej? Jak to się odbywało? Czy lokalizacja była wyznaczana na oko czy była jakaś procedura do wyznaczania lokalizacji?

Skoro wiadomo, że wksel w spektroskopii miał wymiary 1.5 x 1.5 x 1.5 cm i wiadomo, że stężenie glutaminianów w istocie szarej jest 2-4 razy większe niż w istocie białej to czy zostały uwzględnione różnice w procentowej zawartości istoty szarej i białej u różnych osób? To może znacząco wpływać na uzyskane wyniki oraz różnice międzysobnicze. Na stronie 55 wspomniano o segmentacji tkankowej woksela ale nie opisano czy i jak została ona uwzględniona w analizie. Czy dostępna jest tabela z procentowymi wartościami podziału na WM, GM i CSF dla poszczególnych osób w wokselaх we wskazanych lokalizacjach? Jak wyglądały różnice pomiędzy regionami (choćby średni skład procentowy poszczególnych tkanek)?

Jeśli chodzi o wybór basis set-ów czyli modeli dla poszczególnych metabolitów w widmie spektroskopowym to wybrano inne zestawy dla obu skanerów co jest oczywiste. Dla skanera 7T wybrano 27 metabolitów a dla skanera 3T wybrano 18 metabolitów. Prosiłbym o więcej informacji, czy podane basis-sety są wybrane do konkretnych modeli skanerów (czyli Siemens Trio i GE Discovery 950)? Wybór większej ilości modeli do skanera 7T zakłada lepszą jakość uzyskanych widm co w przypadku pomiarów zebranych w niniejszej pracy nie do końca się potwierdziło. Najdokładniejsze podejście do analizy widm z użyciem LCmodel zakłada wykonanie pomiarów na danym skanerze, z użyciem tej samej sekwencji na specjalnie przygotowanych próbkach. Taki lokalny basis-set teoretycznie jest najdokładniejszym rozwiązaniem. Drugim pod względem dokładności jest dobranie basis-setów na dla danego modelu skanera a jeszcze mniej dokładnym jest dobranie tylko wartości pola skanera 3T lub 7T. Chciałbym przy tej okazji zauważyć, że skaner Trio nie ma pola o wartości 3T tylko 2.89T co przekłada się na częstotliwość ok 123.2 MHz dla wodoru. Ma to przełożenie na błędnie przyjęte założenie na stronie 52 gdzie do obliczeń progu szerokości linii bazowej gdzie przyjęto dla skanera Trio 127.7 MHz zamiast wspomnianej rzeczywistej wartości 123.2 MHz. Nie jest to różnica, która ma znaczący wpływ na przyjęte kryteria jakościowe ale warto być precyzyjnym.

Na uwagę zasługuje innowacyjne podejście łączące standardową analizę widm spektroskopowych na podstawie uśrednień z modelowaniem dynamiki zmian poszczególnych metabolitów. Jednakże podejście to opiera się na założeniu, że jedynym parametrem zmiennym między grupami jest stężenie glutaminianu traktowane jako „Variable”, co czyni konstrukcję GLM dość sztuczną i może sugerować pozornie bardziej zaawansowane podejście niż w rzeczywistości. Założenie, że wszystkie pozostałe metabolity są stałe w czasie i między warunkami, może być zbyt silne: jeśli którekolwiek z nich faktycznie ulega subtelny zmianom lub ma źle odwzorowaną linię bazową, to „sztywne” ich utrzymanie może prowadzić do przypisywania tych efektów glutaminianowi (overfitting na jednym parametrze). Dodatkowo granice 0- $\infty$  dla stężeń i parametrów linii (gamma, sigma) są bardzo szerokie; bez dalszych ograniczeń (np. przedziałów opartych na literaturze lub





wcześniejszych pomiarach) mogą dopuszczać nierealistyczne rozwiązania lokalne, które nie zostaną wychwycone.

Podsumowując zastosowane procedury nie są optymalne, ale powinny umożliwić otrzymanie wyników o dobrej jakości z poszczególnych badań.

#### **Uwagi dotyczące prezentacji wyników badań własnych:**

Statystyki wykonane na danych zebranych podczas badań są zaprezentowane w czytelnych tabelach. Przeprowadzone analizy są dobrane adekwatnie. Należy podkreślić, że bardzo skrupulatnie została przeprowadzona kontrola jakości uzyskanych wyników co pozwoliło wyselekcjonować te wyniki, które dawały najbardziej wiarygodne wyniki. Opisane zostały kryteria jakości a wyniki z analizy jakości zostały zaprezentowane w tabelach.

Ponadto, zaprezentowane wykresy i tabele są starannie przygotowane i prawidłowo opisane.

Zaskakujące są widma na stronach 51 i 57 gdzie widmo opisane jako pochodzące ze skanera 3T wygląda na bardziej szczegółowe niż dla skanera 7T (tak jakby w modelu dopasowanym do widma było więcej składowych dla 3T niż dla 7T). Proszę o komentarz do tych obrazków.

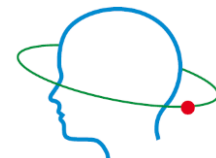
#### **Uwagi dotyczące dyskusji wyników i wniosków:**

Rozprawa doktorska prezentuje wszechstronną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora. Doktorantka wykazuje znakomite opanowanie aktualnego stanu wiedzy, co jest widoczne w szczegółowym omówieniu zarówno kontekstu badań funkcjonalnych dot. czytania (z uwzględnieniem regionów STS, VWFA i mPFC), jak i złożonych zagadnień metodologicznych związanych z funkcjonalną spektroskopią rezonansu magnetycznego (fMRS). Szczegółowa dyskusja hipotezy szumu neuronalnego (neural noise hypothesis) oraz porównanie wyników z literaturą dotyczącą dynamiki glutaminianu i GABA świadczy o zrozumieniu mechanizmów neurochemicznych leżących u podstaw procesów poznawczych (choć warto jeszcze dogłębniej przeanalizować cykl glutaminian-glutamina). Wnioskowanie, pomimo niejednoznaczności wyników empirycznych (np. brak poparcia dla hipotezy szumu neuronalnego w STS), jest prowadzone w oparciu o szeroki kontekst teoretyczny i metodologiczny.

Rozprawa doktorska wykazuje wysoką umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Świadczy o tym:

- Wybór metodologii a konkretnie zastosowanie dynamicznej fMRS (functional Magnetic Resonance Spectroscopy) w regionach indywidualnie zdefiniowanych funkcjonalnie, co jest podejściem innowacyjnym i technicznie bardzo wymagającym.
- Krytyczna analiza wyrażona w pracy autorefleksja na temat ograniczeń metodologicznych, w tym problemów z jakością danych w VWFA, niekonsekwencji między skanerami 3T i 7T, oraz trudności w modelowaniu dynamicznej funkcji odpowiedzi glutaminianu.
- Umiejętność identyfikacji i modelowania kluczowych kowariantów, takich jak płeć, wiek oraz zawartość istoty szarej w wokselu, co jest wyrazem dojrzałości analitycznej.
- Konstruktywne wnioskowanie poprzez wykorzystanie nawet niejednoznacznych lub negatywnych wyników do sformułowania ważnych zaleceń metodycznych dla przyszłych badań w tej dziedzinie.

Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Jest to pierwsza praca badająca zmiany stężenia głównego neurotransmitera pobudzającego (glutaminianu) w odpowiedzi na stymulację związaną z czytaniem w funkcjonalnie zlokalizowanych regionach. Oryginalność polega



na połączeniu badania klinicznej hipotezy dotyczącej dysleksji (hipoteza szumu neuronalnego) z dogłębną analizą wpływu parametrów technicznych fMRS (3T vs. 7T, w tym porównanie CRLB i SNR).

Jest to próba empirycznego ustalenia funkcji odpowiedzi glutaminianu w czasie w kontekście procesów poznawczych, która stanowi ważny krok w kierunku udoskonalenia paradygmatów fMRS. Dostarczone wnioski, wskazujące na subtelność reakcji neurochemicznych na zadania czytania oraz zależność przewagi 7T nad 3T od regionu anatomicznego, mają istotne, oryginalne znaczenie dla planowania przyszłych eksperymentów neuroobrazowania.

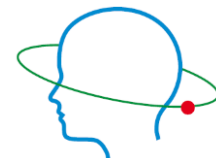
#### **Uwagi dotyczące praktycznego zastosowania uzyskanych wyników badań:**

Wyniki pracy dostarczają kluczowych wskazówek dla projektowania i prowadzenia przyszłych badań fMRS. Badanie uwypukla znaczną trudność w niezawodnym pomiarze sygnałów neurochemicznych w małych regionach korowych, takich jak VWFA (Visual Word Form Area). Niska jakość danych w tym kluczowym obszarze doprowadziła do jego wykluczenia z analizy. Doktorantka sugeruje aby optymalizować umiejscowienia woksela i stosować zaawansowane techniki shimmingu w celu poprawy jakości danych w VWFA. Przewaga skanera 7T nad 3T nie jest uniwersalna, lecz zależna od regionu anatomicznego i metabolitu. Teoretyczne zalety 7T nie są wystarczające, by rekomendować prowadzenie eksperymentów fMRS wyłącznie na skanerach 7T, zwłaszcza biorąc pod uwagę ich wyższy współczynnik SAR i ograniczenia techniczne. Skaner 7T zapewnił lepszą precyzję kwantyfikacji (%CRLB) dla glutaminianu, zwłaszcza w mPFC, ale nie we wszystkich regionach (np. STS). W niektórych przypadkach (np. szerokość linii w mPFC) skaner 3T radził sobie równie dobrze lub lepiej. Brak jednoczesnego pomiaru fMRI utrudnił dokładną korekcję efektu BOLD. Wyniki wskazują, że korekcja BOLD jest krytyczna, ponieważ niektóre początkowo istotne efekty (np. interakcja z płcią w STS przy 7T) zanikały po korekcji. Zauważono również, że szacowanie przesunięcia częstotliwości w celu modelowania ruchu może być niewystarczające. Doktorantka sugeruje, że zadanie czytania pojedynczych, krótkich słów mogło być niewystarczająco intensywne/wymagające dla dorosłych i adolescentów, aby wywołać spójne zmiany neurochemiczne. W przyszłych badaniach fMRS nad czytaniem można rozważyć użycie bardziej wymagających paradygmatów (np. przetwarzanie zdań). Wykazano, że płeć uczestników moderuje dynamikę glutaminianu wywołaną zadaniem zarówno w mPFC, jak i w lewym STS. Kobiety wykazywały silniejsze reakcje na stymulację związaną z czytaniem niż mężczyźni. Stwierdzono, że wiek istotnie wpływa na poziom glutaminianu (systematyczny efekt negatywny), co jest zgodne z procesami dojrzewania, takimi jak przycinanie synaptyczne. Podobnie, ułamek istoty szarej w wokselu jest istotnym czynnikiem zakłócającym, zwłaszcza w indywidualnie lokalizowanym STS. Wiek i frakcja istoty szarej muszą być systematycznie modelowane jako kowarianty, aby uniknąć błędnej interpretacji grupowych efektów neurochemicznych. Chociaż praca bezpośrednio przetestowała hipotezę szumu neuronalnego (zakładającą podwyższony poziom glutaminianu w STS u osób z dysleksją), nie uzyskała jasnego i spójnego poparcia dla tej hipotezy. Wskazuje to na potrzebę zbadania innych mechanizmów neuronalnych związanych z trudnościami w czytaniu i kontynuowania badań multimodalnych w celu rozstrzygnięcia neurochemicznych podstaw dysleksji.

#### **Podsumowanie:**

Tematyka podjętych badań i analiz obejmuje szereg złożonych, i przez to bardzo trudnych do opisu a później interpretacji, procesów integracyjnych w mózgu.

Recenzowana rozprawa doktorska pt.: „Functional Magnetic Resonance Spectroscopy (fMRS) Study on Reading-Related Metabolite Changes” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Zaprezentowane wyniki badań i analiz poszerzają wiedzę z zakresu neurobiologii



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

dysleksji i przede wszystkim świadczą o szerokiej wiedzy teoretycznej i praktycznej Autorki oraz jej umiejętności samodzielnego prowadzenia badań i stosowania nowoczesnych metod badawczych.

Na szczególne uznanie zasługuje połączenie badań neurobiologicznych z wynikami badań neuroobrazowych. Autorka zaprezentowała unikalne umiejętności analizy dynamicznych badań spektroskopii MR.

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. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) i **wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony.**



# Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Katarzyny Wasilewskiej

**Recenzent: prof. dr hab. Maria Sokół, specjalista Fizyki Medycznej**

Zakład Fizyki Medycznej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie,  
Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Gliwicach  
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-102 Gliwice

Tytuł rozprawy doktorskiej: Functional Magnetic Resonance Spectroscopy (fMRS) Study on Reading-Related Metabolite Changes

Promotor: Prof. dr hab. Katarzyna Jednoróg

Promotor pomocniczy: dr Bartosz Kossowski

## Wartość naukowa rozprawy

Naukowy cel rozprawy to określenie różnic poziomu glutaminianu u osób z dysleksją w porównaniu do osób bez tej wady w obszarach mózgu związanych z czytaniem: lewej górnej bruzdzie skroniowej (Superior Temporal Sulcus, STS) i w obszarze wizualnego rozpoznawania słów (Visual Word Form Area, VWFA – jak dowiadujemy się z Dyskusji, został on wyłączony z analizy ze względu na złą jakość widm). Trzeci z uwzględnianych w badaniu obszarów to obszar przyśrodkowej kory przedczołowej (ang. medial PreFrontal Cortex, mPFC) – był obszarem kontrolnym (2.2.5); jest on stowarzyszony z funkcjami semantycznymi/wykonawczymi wyższego rzędu. Doktorantka postanowiła także określić wpływ pola magnetycznego na wyniki eksperymentu – prowadząc go w polach 3T i 7T. Wzięła też pod uwagę różnice płci.

Badania te wpisują się w proces eksperymentalnej weryfikacji teoretycznych modeli obliczeniowych, które opisują zmiany poziomów glutaminianu w mózgu podczas wykonywania zadań. Modele te nie zostały dotychczas wystarczająco sprawdzone.

Jako podstawowe narzędzie Doktorantka zastosowała funkcjonalną spektroskopię rezonansu magnetycznego (Functional Magnetic Resonance Spectroscopy, fMRS) – to technika opracowana na początku lat 90. XX wieku do badania dynamiki metabolizmu mózgu, ale także mięśni i serca. Uzupełnia ona rezonans funkcjonalny (Functional Magnetic Resonance Imaging, fMRI), wiążąc zmiany przepływu krwi (fMRI) z rzeczywistymi zmianami metabolicznymi i neuroprzebiegowymi (fMRS) w celu uzyskania pełniejszego obrazu funkcjonowania mózgu. Wiarygodne zastosowanie fMRS wymaga usunięcia lub skorygowania efektów BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent). BOLD to mechanizm kontrastowy z fMRI, który pozwala „zobaczyć” aktywność neuronalną – gdy neurony się aktywują, wzrasta przepływ krwi i stężenie tlenu we krwi w otaczającym obszarze, a MRI wykrywa różnicę w sygnale magnetycznym między hemoglobina utlenowaną (diamagnetyczną) a odtlenowaną (paramagnetyczną). Pozwala to uwidocznienie aktywnego obszaru mózgu, ale wpływa na szerokości linii fMRS oraz generuje przesunięcie linii na skali przesunięć chemicznych; efekty te to dodatkowa trudność, szczególnie ważna w silnych polach magnetycznych.

Doktorantka wybrała więc trudną – bo wymagającą rozeznania w technikach MRI, fMRI i fMRS – i nowatorską tematykę swojej pracy doktorskiej, co stawia ją w pionierskiej grupie, która toruje drogę kolejnym badaczom. Podjęcie tematu wymagało szerokiej wiedzy teoretycznej i umiejętności jej właściwego zastosowania w badaniach naukowych.

## Zawartość rozprawy

Wstęp teoretyczny rozprawy jest podzielony na zagadnienia związane ze stosowanymi technikami (chodzi tu przede wszystkim o fMRS) oraz dotyczące meritum rozprawy: procesów czytania, zaangażowania określonych części mózgu oraz zaburzeń tych procesów, takimi jak dysleksja i hipotezy neurobiologiczne jej przyczyn.

Doktorantka otwiera swoją dysertację blokiem tematów technicznych: są tu podstawy fizyczne spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, z ang. Nuclear Magnetic Resonance) i struktury widm NMR, znaczenie biologiczne poszczególnych metabolitów, techniczne aspekty rejestracji widm i ich analizy z wykorzystaniem różnych narzędzi. Kolejne kwestie to funkcjonalna spektroskopia rezonansu magnetycznego mózgu a MRS in vivo. Podczas gdy konwencjonalna spektroskopia MRS rejestruje pojedyncze widmo metabolitów z interesującego obszaru, kluczowym celem fMRS jest rejestracja dynamiki procesów metabolicznych mózgu z rozdzielczością od sekund do minut, co zapewnia unikatowy sposób obserwacji mózgu i innych narządów w



działaniu. Wyzwania związane z fMRS obejmują niski stosunek sygnału do szumu (Signal-to-Noise Ratio, SNR) i nakładanie się sygnałów od metabolitów, trudności w interpretacji źródła sygnału (np. neuronalnego vs. metabolicznego, różnych przedziałów komórkowych), problemy z powtarzalnością wyników w różnych badaniach oraz ograniczenia techniczne MR w silnym polu, takie jak niejednorodności pola i nagrzewanie tkanek. Metoda jest więc niezwykle trudna, wymagająca, ale dostarcza bardzo ważnych informacji, co czyni fMRS potężnym narzędziem w medycynie spersonalizowanej, zwłaszcza w neurologii i psychiatrii.

Kolejny element teoretycznego wprowadzenia w tematykę dysertacji obejmuje zagadnienia dotyczące dysleksji, z jej powiązaniem z zaburzeniami w określonych strukturach mózgu oraz płcią. Część wstępną zamykają podrozdziały poświęcone badaniom dysleksji technikami MRS, z podkreśleniem ich niespójności i braku standaryzacji, oraz omówienie hipotezy szumu neuralnego u osób z dysleksją i zwięzłe podsumowanie.

Wstęp szczegółowo określa stan wiedzy w tematyce poruszanej w pracy doktorskiej. **Uważam jednak, że zdecydowanym ułatwieniem dla czytelnika byłoby odwrócenie tematyczne, a więc otwarcie go częścią dotyczącą dysleksji i szumu neuralnego, aby czytelnik uzyskał pojęcie co będzie badane, zanim dowie się czym i jak.**

Część badawczą – *Rozdział 2. Original Study*, rozpoczyna prezentacja celów i hipotez pracy (podrozdział 2.1). Autorka stawia sobie następujące cele szczegółowe:

1. Określenie, czy poziom glutaminianu w obszarach mózgu wrażliwych na język (STS i VWFA) zmienia się pod wpływem bodźca wizualnego związanego z czytaniem (**unikalabym stosowania określenia *stężenie*, ze względu na to, że pomiar stężenia wymaga rejestracji widm w warunkach pełnej relaksacji**).
2. Sprawdzenie hipotezy związanej z szumem neuralnym u osób z dysleksją. Zgodnie z tą hipotezą poziom glutaminianu (najważniejszego neuroprzekaźnika pobudzającego) może być u osób z dysleksją podwyższony.
3. Sprawdzenie, czy obszary specyficzne dla czytania (STS i VWFA) są najbardziej reprezentatywne, czy też można zaobserwować zmiany także w środkowej korze przedczołowej (mPFC to trzeci z analizowanych obszarów).
4. Określenie dynamiki zmian poziomu glutaminianu – pamiętać bowiem należy, że postać funkcji odpowiedzi glutaminianu na stymulację nadal jest w obszarze badań [112]. Dokładny wzorzec czasowy i skala zmian mogą się różnić w zależności od rodzaju stymulacji, stopnia trudności zadania, różnic indywidualnych i parametrów badania.
5. Porównanie dwóch systemów rezonansowych MR – 7T i 3T – pod kątem jakości danych.

Realizacja tych zadań wymagała wyselekcjonowania odpowiednich grup badanych. Grupy te wybrano spośród uczestników projektu NCN promotora rozprawy, prof. Katarzyny Jednoróg, dotyczącego weryfikacji hipotezy szumu neuronalnego. Charakterystykę grup prezentuje podrozdział 2.2. *Methods; Participants* (2.2.1). Były w nich osoby obu płci, zarówno z dysleksją, jak i bez. Badania prowadzono na skanerach o polach 3T (40 uczestników) i 7T (59 uczestników); 37 uczestników zostało poddanych procedurom na obu skanerach. Grupy były zgodne wiekowo oraz ilościowo, odnośnie podziału na podgrupy z dysleksją i bez.

Wszyscy uczestnicy zostali poddani identycznej procedurze obejmującej rozbudowaną procedurę czytania/rozpoznawania tekstu i badanie fMRI – celem określenia obszarów aktywnych w procesie czytania (STS i VWFA), oraz fMRS.

W badaniach anatomicznych stosowane były sekwencje 7T 3D-SPGR (BRAVO) i 3T MPRAGE. Obie są sekwencjami echa gradientowego ważonymi T1. Doktorantka zdecydowała się na akwizycję widm 1H MRS na obu skanerach z wykorzystaniem tej samej sekwencji sLASER. Słuszność wyboru potwierdza najnowsze piśmiennictwo [Morelli M, et. al. Functional Magnetic Resonance Spectroscopy of Prolonged Motor Activation using Conventional and Spectral GLM Analyses. *Imaging Neuroscience* 2025; 3 imag\_a\_00452. doi: [https://doi.org/10.1162/imag\\_a\\_00452](https://doi.org/10.1162/imag_a_00452)]. Sekwencja ta uważana jest za lepszą do pomiaru glutaminianu niż konwencjonalna sekwencja PRESS, ponieważ zapewnia wyższą rozdzielczość widmową i dokładność, szczególnie przy wyższych natężeniach pola magnetycznego.

W analizie danych fMRS (2.2.6) Doktorantka korzystała przede wszystkim z kompleksowego, modułowego zestawu narzędzi FSL-MRS typu open-source. Umożliwia on konwersję danych spektroskopowych, wstępne przetwarzanie, symulację widmową, dopasowanie, kwantyfikację i wizualizację. Przetwarzanie i dopasowywanie FSL-MRS działa na danych MRS zapisanych w otwartym formacie plików NIFTI (Neuroimaging Informatics Technology Initiative).



FSL-MRS udostępnia narzędzia pozwalające na skorelowanie danych MRS i fMRI/MRI, co pozwala na kompleksową analizę funkcji i chemii mózgu. W badaniu fMRS podstawowym celem Doktorantki było rejestrowanie poziomu glutaminianu w obszarach STS i VWFA w odpowiedzi na stymulację wizualną, a poszczególne kroki zostały opisane i skomentowane w kolejnych punktach podrozdziału.

Aby zbadać związek między glutaminianem a odpowiedzią BOLD-fMRI w czasie, zmiany szerokości linii widmowej wygenerowane przez odpowiedź BOLD zostały skorygowane za pomocą poszerzenia linii. Doktorantka zastosowała proces, który sprowadzał szerokości połówkowe sygnału kreatyny/fosfokreatyny do podobnych wartości. Praca [73] autorstwa Ib et. al. stanowi wprowadzenie do tej metodyki dla pola 7T, ale Doktorantka nie przywołuje w tym miejscu ich protokołu. Praca ta wspomniana jest jedynie we wstępie (1.1.3), a szkoda, bo biorąc pod uwagę niejednorodności standaryzacji protokołów fMRS w piśmiennictwie, warto byłoby porównać różne sposoby podejścia do analizy widm fMRS, o czym wspominam też w uwadze 2.

Skoro jesteśmy przy analizie widm fMRS, chcę zapytać, dlaczego przy analizie jakości widm Doktorantka nie sięgnęła do nietłumionego sygnału wody – jest on zapisywany w osobnym pliku danych spektroskopowych, a jego parametry mogą stanowić kluczowe wewnętrzne odniesienie do ilościowego oznaczania metabolitów i jakościowej kalibracji widm. Zastanawiam się, czy „pobrana” z plików nietłumionego sygnału wody poprawka jakościowa (niwelująca różnice „wyshimmowania”) nie poprawiłaby jakości analiz metabolicznych?

Druga kwestia: czy Doktorantka jest pewna identyfikacji sygnału glutaminianu (Glu), innymi słowy, czy glutamina (Gln) nie stanowi tu problemu poprzez istotne zaburzenie integralnej intensywności pasma? Oba metabolity są elementami bazy, ale są wyjątkowo trudne do rozdzielania w spektroskopii MR ze względu na duże nakładanie się widm i wrażliwość na warunki rejestracji, co powoduje „błąd bazowy w dopasowaniu” – dlatego ich sygnały Gln i Glu często traktowane są wspólnie jako „Glx”, choć czasami nie jest to wskazane, bowiem Gln i Glu mogą się zmieniać w przeciwnych kierunkach. Wzrosty lub spadki sygnału glutaminianu w badaniach fMRS mogą być spowodowane przemieszczeniami neuroprzekazników między przedziałami komórkowymi o różnej „widoczności” z punktu widzenia MRS (chodzi tu o różnice w czasach relaksacji T2 w różnych otoczeniach) [Emelianova P et. al. Evidence for biexponential glutamate T2 relaxation in human visual cortex at 3T: A functional MRS study. NMR in Biomedicine 2024;37(12) <https://doi.org/10.1002/nbm.5240>][112].

Badany obszar powinien więc być dobrze zidentyfikowany pod względem składu – mam na myśli udziały substancji białej i szarej. Na str. 55 wspomniana jest segmentacja, potem Doktorantka wskazuje ten element pomiarów w różnych miejscach, ale brakuje mi jasnego odniesienia się do rezultatów tej procedury w analizie danych (na przykład w 3.1.3. *fMRS Results*). Czy analiza integralnej intensywności sygnału NAA, markera neuronalnego, nie byłaby przydatna?

W polu 7T MRS mamy lepszy stosunek sygnału do szumu (SNR) i rozdzielczość widmową niż w polu 3T, a to umożliwia łatwiejsze rozdzielanie nakładających się sygnałów glutaminianu (Glu) i glutaminy (Gln) i bardziej niezawodną kwantyfikację, jednak kosztem wpływu niejednorodności pola (B0) – w tym przypadku konieczna jest optymalizacja sekwencji (dobór TE i dobre „shimmowanie” – tu wracamy do analizy nietłumionego sygnału wody jako markera jednorodności pola), aby dokładnie rozróżnić Glu/Gln.

Chcę podkreślić, że analiza widm fMRS wymagała od Doktorantki ogromnej pracy, związanej z przygotowaniem merytorycznym oraz skutecznym wykorzystaniem złożonego oprogramowania. Problem badawczy jest tu bardzo złożony – i badawczo, i od strony jego znaczeń w różnych dziedzinach wiedzy, a Doktorantka wytycza ścieżki, które prowadzą do wyjaśnienia go. Nie można się spodziewać, że już w pierwszym kroku badań będziemy wszystko wiedzieć o badanym zagadnieniu, ale ten pierwszy krok jest konieczny.

Analizy statystyczne danych z obu skanerów zostały wykonane przy użyciu bezpłatnego oprogramowania statystycznego JASP (Jeffreys's Amazing Statistics Program) w wersji 0.19 oraz 0.95. W analizie behawioralnej stosowano analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami (ANOVA) i jej bayesowski odpowiednik. Są to metody służące do analizy danych, w których te same osoby lub jednostki badawcze są mierzone wielokrotnie w różnych warunkach i/lub w różnych punktach czasowych. Pozwala to na ocenę, czy obserwowane różnice między tymi pomiarami są statystycznie istotne, przy jednoczesnym kontrolowaniu zmienności wynikającej z indywidualnych różnic między badanymi. Metodologia ta jest często stosowana w psychologii, medycynie i naukach społecznych. Doktorantka bardzo trafnie wybrała narzędzie statystyczne.



Rozdział 3 prezentuje wyniki trzech eksperymentów. W pierwszym z nich (punkt 3.1. *Experiment 1 – fMRS on 7T scanner*) widma  $^1\text{H}$  fMRS rejestrowano na skanerze 7T (29 osób z dysleksją, 30 bez; obie grupy zgodne odnośnie podziału na płci, wiekowo, w kwestii statusu społeczno-ekonomicznego). Grupy zostały dobrze scharakteryzowane i dobrane. **Problemem pozostaje ich liczność przy podziale na poszczególne podgrupy. Tabele 2-5 grupują wyniki analiz statystycznych – dla obszarów mPFC i STS. Szkoda, że opisy tabel nie identyfikują jednoznacznie eksperymentu – brak tu informacji o lokalizacji (jest ona wpleciona w bloki tabeli) oraz tego, że dane dotyczą grupy badanej w polu 7T. W dalszej części rozdziału jest ten sam problem, choć w Tabelach 9 i 10 informacja jest!**

W Tabeli 5 (z podrozdziału 3.1.3.1, *Ocena jakości*) pojawia się sygnał N-acetyloasparaginy (NAA). Jest to singlet, dobrze widoczny w widmie MRS mózgu zdrowej osoby dorosłej przy około 2.01-2.02 ppm. Jest on oczywiście uwzględniany w zestawie bazowym, ale Doktorantka powinna wytłumaczyć czytelnikowi dlaczego ten sygnał jest bardzo użyteczny w analizie parametrów jakościowych widm MRS.

W przypadku fMRS dolna granica nierówności Cramera-Rao (CRLB) dla glutaminianu powinna być niska, najlepiej poniżej 20% (często poniżej 10–12%), aby można było uznać pomiary za wiarygodne. W obu podejściach – 7T i 3T – Doktorantka uzyskała potwierdzenie dobrej jakości danych.

Kolejna część pracy (3.1.3.2) dotyczy analizy danych pod kątem sposobu ich grupowania. Dla 7T, zarówno w mPFC, jak i w STS nie stwierdzono istotnych efektów stymulacji. **Czy nie dawało to możliwości, aby połączyć grupy do pewnych analiz statystycznych zwiększając ich siłę statystyczną?**

Na rysunkach podających zależność poziomu glutaminianu od różnych czynników (począwszy od rysunku 14 w tym podrozdziale i dalej w kolejnych) **na osi y poziom glutaminianu jest odnoszony do sygnału kreatyny/fosfokreatyny, uważanego w widmie MRS za najstabilniejszy – jest to forma normalizacji, o której powinna Doktorantka wspomnieć w części technicznej swojej pracy.**

Dane fMRS grupowane według opóźnienia (3.1.3.3) obejmują analizę zmian poziomu glutaminianu w czasie od zastosowanego bodźca. Dla 7T w obszarze mPFC pewne różnice statystyczne były istotne przed korektą BOLD, po niej już nie. Z kolei w STS zaobserwowano trend – dla opóźnień 500-4500 ms, który utrzymał się i po korekcie BOLD.

W przypadku danych analizowanych przy użyciu metody uśredniania dynamicznego (3.1.3.4) w mPFC zaobserwowano różnice między grupami (dyslektycy, kontrolna) i w obrębie grupy dyslektycznej stymulowanej w określony sposób. Po korekcie BOLD zachowały się pewne trendy, głównie dotyczące mężczyzn z dysleksją.

**Punkty grupowania wg. typu symulacji i wg. opóźnień 3.1.3.2-3 otwierają listy parametrów jakości widm rejestrowanych w polu 7T dla obszarów mPFC i STS – skąd one są? Czy z Tabel? Dla jakich opóźnień są to wartości?**

**Na czym Doktorantka bazuje twierdząc, że udział substancji szarej istotnie wpływa na poziom glutaminianu (str. 82)? Czy na segmentacji tego obszaru, jak wynika procedury opisanej na str. 55? Domyślam się, że na mierze metody BF-MCL ANOVA (Bayesian Factor inclusion ANOVA) – na co wskazują przywoływane współczynniki. Takiego precyzyjnego wyjaśnienia mi tutaj brakuje, choć na str. 78 pojawia się informacja, że przeprowadzono analizy ANOVA danych fMRS. Czy Doktorantka rozważała zintegrowanie segmentacji obszarów z analizą integralnej intensywności NAA, markera neuronalnego, jako dodatkowego testu?**

Punkt 3.1.3.4 opisuje eksperyment 1 w trybie dynamicznym – rejestrację widma 7T fMRS powtarzano w sekwencji czasowej 500, 1000, 3000 i 4500 ms dla dyslektyków i grupy kontrolnej. Obszary poddane analizie to mPFC i STS. Statystycznie istotne różnice widoczne były w grupie dyslektycznej, a po korekcie BOLD ujawniły się trendy związane z płcią.

Podrozdział 3.2. *Eksperyment 2 – fMRS przy użyciu skanera 3T* ma podobną strukturę jak podrozdział poprzedni. Rozpoczyna go charakterystyka behawioralna badanych grup (3.2.1), a podsumowanie zawarte jest w Tabelach 6 i 7. Wynika z niego, że płeć nie wpływa na zróżnicowanie.

Punkt 3.2.2 opisuje podobny eksperyment z rozpoznawaniem słów – teraz w skanerze 3T. Skanowano obszary mPFC i STS. Zaobserwowano statystycznie istotne różnice między badanymi grupami – kontrolną i dyslektyków, a wyniki statystyk pokazuje Tabela 8. Znajdziemy tu rezultaty testu ANOVA: statystykę F (sprawdza, czy średnie grup są różne (istotność statystyczna)) i parametr Eta kwadrat ( $\eta^2$ ) (mierzy odsetek wariancji wyjaśniony przez czynnik – wielkość efektu), oraz wartości p. Dla obszaru mPFC istotna okazała się płeć. W obszarze STS obserwowano tylko trend.



Podrozdział 3.2.3 *Results* podsumowuje kwestie związane z jakością danych dla glutaminianu i NAA w obszarach mPFC i STS i dla różnych warunków stymulacji – analizie poddano stosunek sygnału do szumu (SNR) i parametr %CRLB (dolna granica Craméra-Rao to parametr określający minimalną możliwą wariancję dla każdego nieobciążonego estymatora danego parametru populacji, wskazujący maksymalną możliwą precyzję). Z kolei szerokości połówkowe dla NAA mierzonego w obu wskazanych obszarach w różnych warunkach stymulacji umieszczono w Tabeli 10.

Niektóre widma zostały wyłączone z dalszych analiz po korekcie BOLD (czego dowiemy się z punktu 3.2.3.2), a efekty tej korekty pokazane zostały w kontekście pogrupowania wg. typu symulacji (3.2.3.3) i wg. efektu opóźnienia (3.2.3.4) dla obszarów mPFC i STS. W mPFC analiza ANOVA nie wskazuje statystycznie istotnych efektów stymulacji; korekta BOLD ujawnia trend związany z wiekiem. Podobnie w STS – nie zaobserwowano efektów stymulacji, choć Doktorantka zwraca uwagę na wzrost poziomu glutaminianu w substancji szarej. W obszarze STS po korekcie BOLD ten efekt się utrzymał. Dodatkowo Doktorantka zwraca uwagę na trendy oraz statystycznie istotne wyróżnienie grupy dyslektycznej kobiet względem grupy kontrolnej kobiet i mężczyzn w grupie dyslektycznej.

Analiza obszaru mPFC (3.2.3.4), uwzględniająca różne opóźnienia czasowe między początkiem stymulacji a akwizycją widma, ujawniła statystycznie istotną interakcję między rodzajem stymulacji, grupą i płcią, choć w przypadku stymulacji fałszywym ciągiem znaków obserwuje się tylko trend, podobnie tylko trend jest widoczny dla porównań różnych opóźnień. **Podpis pod Rysunkiem 26 identyfikuje grupę – są to kobiety. A o kogo chodzi na rysunkach 27 i 28? Opis rysunku powinien być jasny i konkretny, nawet jeśli piszącemu go wydaje się, że powtarza informacje – czytelnik bez takiego opisu się gubi.**

Po korekcie BOLD dla obszaru mPFC zachowywane są wcześniej obserwowane zależności. W STS przed i po korekcie BOLD można tylko doszukiwać się trendów zmian poziomu glutaminianu przy różnych warunkach.

Kolejny podrozdział dotyczy uśrednienia dynamicznego (3.2.3.5) widm rejestrowanych w polu 3T. **Jakim narzędziem Doktorantka się tu posługiwała – czy techniką FSL-MRS, o której wspomina na str. 60 i str. 83, a która wykorzystuje dopasowanie Ogólnego Modelu Liniowego (GLM)? Taka informacja o zastosowanym narzędziu tu także powinna się znaleźć.**

Wyniki uśrednienia dynamicznego w obszarze mPFC dla pola 3T wyróżniają grupę kobiet z grupy kontrolnej. Widoczny też jest wpływ opóźnienia w przypadku stymulacji poprawnym słowem oraz fałszywym ciągiem znaków (rysunek 34). **Czy też dotyczy grupy kontrolnej?**

Korekta BOLD zachowuje wcześniejszą zależność między typem stymulacji, grupą i płcią. Ujawnia także trendy w grupach dyslektycznej i kontrolnej zależne od płci (Rysunek 35a), a w grupie kobiet grupy kontrolnej od typu stymulacji (Rysunek 35b). Wpływ opóźnień na stymulację słowną pokazał statystycznie istotną różnicę między opóźnieniami 1000 i 4500 ms – **czy dotyczy to wszystkich badanych?**

Najbardziej interesujące wyniki analizy obszaru STS zostały przedstawione na rysunku 37. Statystycznie istotne różnice są widoczne w grupach podzielonych na płci: dla opóźnień 500 i 1000 ms (odpowiednio dla kobiet i mężczyzn) **(dyslektycy czy grupa kontrolna, czy wszyscy badani?)** w funkcji typu bodźca (rysunek 37 ab) oraz w funkcji czasu opóźnienia (rysunek 37cd). Po korekcie BOLD ten obraz został zasadniczo utrzymany (rysunek 38).

**Podrozdziały *Results* prezentujące *eksperyment 1 i 2* przytłaczają sposobem prezentacji wyników i parametrów statystycznych. Czytelnik gubi się w litym tekście literek i cyferek. Jeśli materiał ten ma być przedmiotem publikacji, jej przygotowanie będzie wymagało istotnego i jasnego „przeformatowania” zawartości.**

Podrozdział 3.3 *dotyczy eksperymentu 3*, który zajmuje się porównaniem jakości danych spektroskopowych rejestrowanych w obszarach mPFC i STS na skanerach 3T i 7T. W porównaniach wykorzystano szerokości połówkowe linii widmowych mierzone w połowie wysokości sygnału (LWHM), stosunek sygnału do szumu (SNR) oraz dolną granicę Craméra-Rao (%CRLB) (punkt 3.3.1, str. 123).

**W 3.3. (ani później) Doktorantka nie przypomina czytelnikowi jakie były parametry sekwencji impulsowej przy rejestracji widm MRS – a to ważne! Porównanie parametrów widmowych linii spektralnych w polach 3T i 7T możemy znaleźć w pracy Pradhana i wsp. [125]. Doktorantka przywołuje tę pracę dopiero w części 4.5. *Dyskusji*. Uważam, że w punkcie 3.3. jest miejsce na odniesienie się do metodologii i wskazanie ewentualnych różnic. Kolejna ważna praca to [117], bo również zawiera dobrze opracowany protokół pomiarowy fMRS dla pól 7T i 3T i z uwzględnieniem sekwencji sLASER.**



Zupełnie nie rozumiem sensu podrozdziału 3.3.1. – co Doktorantka porównuje? Może tu ukrył się poszukiwany przeze mnie sygnał nietłumionej wody? ☺

We wstępie do tego podrozdziału Doktorantka wskazuje, że będzie analizować jakość danych spektroskopowych porównując szerokości połówkowe NAA z widm fMRS zarejestrowanych w 3T i 7T. Dobry wybór, bo NAA to najwyższy sygnał singletowy (a to ważne!) w widmie, ale potem wymieniony jest glutaminian. Dlatego chcę się dowiedzieć, jak rozumieć szerokość połówkową pasma glutaminianu? Jak była ona mierzona – czy z wybranej linii multipletu Glu, czy na przykład rejestrowano widma J-resolved?

Wybór NAA jako markera jakości widma MRS jest bardzo trafny. Chociaż pole 7T zapewnia lepszy stosunek sygnału do szumu (SNR), uzyskanie wąskich linii NAA wymaga jednak wysokiej jednorodności pola B<sub>0</sub> (główne pole magnetyczne, B<sub>0</sub>, staje się mniej jednorodne ze względu na zwiększone efekty podatności). Jednorodność pola zależy istotnie od tzw. „wyshimmowania” i jej zaburzenia będą powodować przypadkowy rozrzut wartości LWHM, czego Doktorantka jest świadoma. Jednorodność można oceniać **porównując parametry sygnału wody z widma referencyjnego rejestrowanego bez tłumienia wody (zazwyczaj sekwencja VAPOR przy sLASER) – taka analiza powinna się w tej części pracy znaleźć. Jeszcze raz wracam do podrozdziału Linewidth ze strony 123 – czy dotyczy wody? ☺**

Sygnałem, który jest „dobry” do charakteryzowania jakości widm jest też sygnał kreatyny/fosfokreatyny – czy singlet przy 3.05 ppm był analizowany?

W punkcie 3.3.2 porównano współczynniki SNR. Zazwyczaj SNR jest wyższy w wyższym polu i to się potwierdza w *Eksperymencie 3* dla glutaminianu w obszarze mPFC – tu **ponawiam pytanie o zakres widmowy wybrany przez Doktorantkę jako „główny pik metabolitu” (bo Glu to jest pasmo)?** Dla obszaru STS nie stwierdzono różnic. **Nie wiem, czy „wydzielanie” Glu z Glx nie jest na szkodę tym kalkulacjom. Może w 3T tak, a w 7T nie? Jestem ciekawa opinii Doktorantki.**

Wartości SNR dla N-acetyloasparaginanu są podobne w 3T i 7T i dla obu analizowanych obszarów.

W punkcie 3.3.3. *Procentowa dolna granica Cramera-Rao (%CRLB)* podane są miary dla metabolitów Glu i NAA mierzonych w obszarach mPFC i STS. W NMR dolna granica Cramera-Rao (%CRLB) nie jest bezpośrednią miarą sygnału, lecz teoretycznym minimum niepewności (odchylenia standardowego) w szacowaniu parametrów takich jak stężenia metabolitów z zaszumionych widm, zwłaszcza w trudnych badaniach in vivo; niska wartość %CRLB (np. <10%) sugeruje dobrą precyzję. Wartości %CRLB są dla Glu znacząco niższe w obu obszarach dla pola 7T niż dla 3T, natomiast dla NAA tylko w mPFC widać istotną przewagę pola 7T nad 3T.

Punkt 3.3.4 dotyczy porównań szerokości połówkowych (FWHM) linii NAA w mPFC i STS w polach 7T i 3T. W mPFC linia NAA jest węższa w polu 3T. W obszarze STS nie ma różnicy.

*Dyskusja* (str. 135; 4.1) podsumowuje uzyskane przez Doktorantkę rezultaty eksperymentów w sześciu punktach. W siódmym Doktorantka przedstawia ograniczenia swojej pracy.

Punkt 1 to komentarz do zmian poziomów glutaminianu, a Doktorantka porównuje względne poziomy metabolitu w różnych warunkach).

**Rozpoczyna go fragment dotyczący kłopotów z jakością widm fMRS z obszaru VWFA – te wyjaśnienia powinny być raczej umieszczone w części *Results*, z adnotacją, że dane nie nadają się do analizy.**

W polu 7T wyniki analizy widm fMRS z obszaru STS wykazały wzrost poziomu glutaminianu w odpowiedzi na bodziec w porównaniu stanu bez bodźca. Ten zależny od pfc efekt zanikał po korekcie BOLD. Natomiast w polu 3T efekt bodźca – wzrost poziomu glutaminianu, mógł być zauważony dopiero po korekcie BOLD. Obserwowanie efektów metabolicznych po korekcie BOLD w fMRS ma na celu potwierdzenie, że wykrywane są rzeczywiste zmiany neuronalne/metaboliczne wykraczające poza artefakty magnetyczne (BOLD), dlatego tak ważne jest staranne zaplanowanie eksperymentu. Doktorantka otwarcie tu przyznaje, że obserwowane przez Nią różnice między wynikami dla pól 7T i 3T mogą wynikać z różnic w liczności grup.

Swoje obserwacje Doktorantka zestawia z pracą Pasanty i współpracowników [120], którzy wskazali, że dla metabolitu o niskim poziomie uwiarygodnienie efektu metabolicznego wymaga większych grup.

Co ważne, Doktorantka jest świadoma kwestii metodologicznych związanych z właściwą identyfikacją badanego obszaru i strukturą zadania; podkreśla rolę tych czynników, co wskazuje, że w kolejnych eksperymentach będzie chciała te zaburzenia eliminować.



W drugim punkcie Dyskusji (4.2.) Doktorantka rozważa prawdziwość hipotezy związanej z szumem neuralnym u osób z dysleksją. Hipoteza przewiduje wyższy poziom glutaminy w lewym obszarze STS dyslektyków. Niewiele jest prac poświęconych temu zagadnieniu. Doktorantka jest współautorką jednej z nich [56], odsyła więc czytelnika do tej właśnie pracy, opublikowanej w czasopiśmie *eLife*, o wysokim współczynniku IF – i konkluduje, że choć hipoteza szumu neuronalnego pozostaje ważną ramą teoretyczną, to nie wyjaśnia neurochemicznych podstaw dysleksji – potrzeba tu dalszych badań prowadzonych na dużych grupach.

Także i w tym przypadku problemem pozostaje sprzeczność obserwacji dla pól 7T i 3T. Piśmiennictwo nie pozwala rozwiązać zagadki, dostarczając sprzecznych rezultatów, co oznacza, że konieczne są dalsze eksperymenty.

W punkcie 4.3 Dyskusji Doktorantka analizuje znaczenie badanych obszarów mózgu w procesie czytania, a punkt 4.4 omawia zmiany poziomu glutaminy w czasie po symulacji. Doktorantka podkreśla tu ważny aspekt swoich badań: dotychczas brak jest eksperymentalnej weryfikacji modeli obliczeniowych opracowanych przez badaczy, takich jak Paul Mullins (i jego współpracownicy) [112]. Modele te opisują, jak zmieniają się poziomy glutaminy w mózgu podczas wykonywania zadań. Ponieważ poziom glutaminy nie jest statyczny, lecz dynamicznie zmienia się w zależności od aktywności mózgu, co można wykryć za pomocą fMRS, Doktorantka wybrała cztery punkty czasowe: 500, 1000, 3000 i 4500 ms (500 ms to stymulacja) po stymulacji, aby sprawdzić poziom Glu bezpośrednio po zadziałaniu bodźca, jak i po czasie od bodźca – i stwierdza, że choć bezpośrednie jednoznaczne potwierdzenie teorii nie było możliwe, to jednak eksperyment pokazał ogromny potencjał fMRS i zidentyfikował wyzwania metodologiczne tej metody. Świadoma mocnych i słabych stron metody badawczej Doktorantka nakreśla w ten sposób plan przyszłych eksperymentów.

Celem punktu 4.5 Dyskusji jest analiza jakości danych rejestrowanych na skanerach 3T i 7T. We wcześniejszej części recenzji zwracałam uwagę na rolę czynników wpływających na jakość widm MRS przy obu natężeniach pola magnetycznego: **jest to komentarz do Eksperymentu 3** (str. 123). Myślę, że dopóki nie będzie pewnej miary jakości widm w polach 7T i 3T, wszelkie rozbudowane komentarze są przedwczesne. Jakość fMRS różni się też w zależności od analizowanego obszaru mózgu – co także zauważa Doktorantka. Różnice regionalne wiążą się zazwyczaj z różnicami w metabolizmie badanych obszarów, różnicami w składzie komórkowym (istota szara kontra istota biała), różnicami w zapotrzebowaniu na energię, w unaczynieniu i niejednorodnościach pola magnetycznego. Dlatego właśnie Doktorantka wybrała obszary STS (bruzda skroniowa górna) i mPFC (środkowa część kory przedczołowej), bo wykazują różne profile metaboliczne ze względu na ich różne role funkcjonalne. Wszystkie te czynniki mogą być wyodrębniane tylko wtedy, gdy mamy właściwy system badania jakości widm.

**Doktorantka na stronie 148 rozważa kwestie związane z różnicami w jakości widm, ponownie odwołując się jakiejś nieokreślonej szerokości linii i do „linewidth threshold” dla skanerów 7T i 3T. Całe szczęście! pojawia się wśród tych rozważań jeden odnośnik do pracy [117], z którego dowiedziałam się, że zarówno w tych rozważaniach, jak i opisie Eksperymentu 3 chodzi o nietłumiony sygnał wody. Naprawdę szkoda, że Doktorantka nie przyjrzała się lepiej cytowanej publikacji [117], bo zawiera ona nie tylko tę informację, ale również dobrze opracowany protokół pomiarowy fMRS dla pól 7T i 3T i z uwzględnieniem sekwencji sLASER. Bardzo proszę Doktorantkę o wyjaśnienia w tej kwestii.**

W punkcie 4.6. Doktorantka przygląda się wpływowi czynników takich płeć, wiek i udział substancji szarej i białej w wokselu pomiarowym. Krytycznie patrzy na wpływ tych czynników odwołując się do piśmiennictwa. **Tu także przywołuję swoje wcześniejsze uwagi na ten temat.**

Dyskusję kończy podrozdział 4.7. *Limitations*, w którym rozważany jest wpływ konstrukcji eksperymentu, jego czasu trwania i zagadnień technicznych, o których wspominałam wcześniej w recenzji. Powtarzalność wyników fMRS jest ograniczona przez niejednorodne metody eksperymentalne na kilku poziomach, w tym w pozyskiwaniu wyników MRS, projekcie eksperymentu i analizie danych. Problemy z fMRS są powszechne i dlatego takie analizy jak ta, przedstawiona w tej rozprawie, są niewątpliwie potrzebne. Wskazuje na to także cytowany tu odnośnik do projektu Big fMRS ([https://mrshub.org/projects\\_big\\_fmrs/](https://mrshub.org/projects_big_fmrs/)), który ma stanowić platformę poprawy jakości analiz fMRS.

Ostatni element rozprawy doktorskiej to wnioski, przedstawione krótko i ostrożnie, bez radykalizmów, ale ze wskazaniem dalszych dróg poszukiwania doskonalszych odpowiedzi na postawione pytania.

W rozprawie oparto się na 183 cytowanych publikacjach.



### Wartość merytoryczna rozprawy

Podjęcie tematu związanego z funkcjonalną spektroskopią rezonansu magnetycznego wskazuje, że Doktorantce nie są obce najświeższe tematy z neurodiagnostyki i neurobiologii. Technika fMRS wykracza bowiem poza tradycyjne obrazowanie i pozwala badać metaboliczne podstawy funkcjonowania mózgu oraz sprawdzać teoretyczne modele obliczeniowe. fMRS to jedyna nieinwazyjna metoda, która umożliwia bezpośredni pomiar dynamiki metabolizmu komórkowego i neurotransmisji w żywym mózgu człowieka. Podczas gdy fMRI pokazuje, gdzie zachodzi aktywność (hemodynamika), fMRS ujawnia, jak zmienia się chemia mózgu podczas wykonywania zadań, śledząc metabolity, takie jak mleczan, glukoza i neuroprzekaźniki w czasie rzeczywistym. Doktorantka musiała poznać główne techniki rezonansu magnetycznego – MRI, fMRI i MRS – żeby sięgnąć do fMRS. Musiała też zastosować bardzo wyrafinowane narzędzia analizy danych, aby wydobyć znaczenie zmian. Zaangażowanie się w tak złożoną tematykę wymagało niewątpliwie odwagi i wysokiej ogólnej wiedzy teoretycznej.

Hipotezy badawcze postawione zostały przez Doktorantkę jasno, a dobór metod badawczych i narzędzi analitycznych jest właściwy. Rozprawa doktorska niewątpliwie prowadzi w oryginalne i ważne obecnie obszary naukowe, do których dotychczas nie było dostępu. fMRS pozwala zrozumieć funkcjonowanie mózgu w zdrowiu i chorobie oraz opracować biomarkery schorzeń neurologicznych i psychiatrycznych. Doktorantka wykazała się samodzielnością w eksplorowaniu tej trudnej i wymagającej tematyki.

Potwierdzeniem merytorycznej wartości rozprawy doktorskiej są dwie publikacje, w których Doktorantka jest drugim współautorem – w *Journal of Neuroscience*, 2024 – o współczynniku IF 4, oraz w czasopiśmie *eLife*, 2025, o IF ok. 6 (dane z 2023). Doktorantka prezentowała też wyniki na konferencjach (cztery wystąpienia ustne i dwa postery).

### Uwagi krytyczne

Myślę, że rzadko praca doktorska jest „gładkim” naukowym tworem. Jeśli jest, to jest to wręcz niepokojący fakt. Cieszę się, że w tym przypadku tak nie jest, bo rozprawa pobudza do dyskusji. Przedstawiony w rozprawie materiał naukowy jest bardzo szeroki – obejmuje obszary fizyki, biofizyki, biologii i neurobiologii, a także medycyny. Doktorantce przychodzi korzystać z wyrafinowanych urządzeń diagnostycznych – tomografów MR 7T i 3T, ich zaawansowanych możliwości analitycznych oraz szerokiego zestawu narzędzi analizy danych. To ogromnie trudne przedsięwzięcie i jestem pełna podziwu, że daje sobie radę! Jako czytelnik-fizyk szukałam w tym bogatym materiale odpowiedzi na swoje wątpliwości. Innymi słowy recenzowana przeze mnie praca stała się dla mnie polem dyskusji. Wspomniane wątpliwości, pytania i uwagi zaznaczyłam w tekście recenzji **czcionką pogrubioną**. Prosiłabym więc Doktorantkę o krótkie skomentowanie tam przedstawionych wątpliwości i pytań.

Dodatkowe pytania prezentuje jeszcze poniższa lista:

1. Podstawowe moje pytanie dotyczy liczności grup – przy takim podziale na liczne podgrupy badane, siła statystyczna ewentualnych różnic – jeszcze przy uwzględnieniu licznych czynników zaburzających – będzie żadna. W rozdziale *Limitations* Doktorantka zgłasza taką wątpliwość. Jest to jeden z najczęstszych problemów w badaniach grup. Czy istnieje możliwość dodania do grup kolejnych uczestników?
2. Brakuje mi w rozprawie pełnego opisu protokołu pomiarowego, który ułatwiłby poruszanie się po złożonej strukturze pracy. Do dyspozycji jest kilka protokołów już istniejących: publikacja zespołu eksperckiego Lin et al. [98] podaje ogólne wytyczne dla MRS; z kolei przykładowy protokół oznaczenia poziomu Glx (glutaminian+glutamina) fMRS proponuje Frank et. al. [Protocol to conduct functional magnetic resonance spectroscopy in different age groups of human participants. *STAR Protoc.* 2023 Sep 15;4(3):102493. doi: 10.1016/j.xpro.2023.102493] – autorzy rejestrują widma przy różnych czasach TE i obliczają widma różnicowe; podobnie proponuje zespół Emeliyanowa i wsp. [Emeliyanova P et. al. Evidence for biexponential glutamate T2 relaxation in human visual cortex at 3T: A functional MRS study. *NMR in Biomedicine* 2024;37(12) <https://doi.org/10.1002/nbm.5240>] – tu zastosowano TE od 9.3 do 280 ms do wyznaczenia przyporządkowania Glu między przedziałą komórkowe (z marnym efektem). I wreszcie praca ekspercka – [117], zawiera dobrze opracowany protokół pomiarowy fMRS dla pól 7T i 3T i z uwzględnieniem sekwencji sLASER. Dobrze wypunktowany protokół własnych badań fMRS ułatwiłby analizę wyników, a porównanie go z innymi może stanowić dobry materiał do publikacji.
3. Rysunek 1 – z pracy [50] – pokazuje widmo <sup>1</sup>H MRS lewego płata skroniowego zdrowej osoby dorosłej w 3T. Czytelnik nie jest o tym informowany, a nawet sugeruje mu się w podpisie rysunku, że to mózg osoby autystycznej. Co więcej, choć na rysunku 1 sygnały są oznaczone, niekoniecznie przyporządkowanie



sygnałów jest bez zastrzeżeń. Pamiętać należy, że w badaniu 1H MRS mleczan rezonuje przy 1.33 ppm, jednak jako główne źródło energii dla neuronów jego widoczność na widmie w stanie spoczynku jest słaba, a zanieczyszczenie tego przedziału przesunięć chemicznych lipidami i makrocząsteczkami utrudnia jego kwantyfikację. Aby zidentyfikować pik mleczanu przy 1.33 ppm w widmie 1H MRS, należy poszukać odwróconego dubletu w tym miejscu w sekwencji echa spinowego uzyskanej z długim czasem echa (TE), wynoszącym około 135–144 ms. Czy Doktorantka przyglądała się „swoim” widmom pod tym kątem – czy widać mleczan, czy też nie?

4. W podrozdziale 2.2.6. dla obu systemów MR – 3T i 7T – prezentowane są listy uwzględnianych w zbiorze bazowym metabolitów. Nie podano jednak jakie związki chemiczne się kryją pod skrótowcami. Niektóre ze skrótów są wymieniane na liście skrótów (strony 7-8), inne nie. Co więcej w opisie bazy dla 3T wymienianych jest 18 widm metabolitów bazowych, a na rysunku 9 jest ich 20. De facto nie wiadomo jakie były te dopasowywane bazy.
5. Brak oznaczeń metabolitów na rysunkach. Rysunki 10a i 10b są całkowicie pozbawione identyfikacji. Z kolei na rysunkach 8 i 9 nawet dobry wzrok nie pozwala zidentyfikować koloru elementu bazy z metabolitem. Rysunek 9 pokazuje co będzie dopasowywane, ale efektu dopasowania nie widzimy. Podobny problem identyfikacji pojawia się na rysunkach 11, 12, 13. Nie oznaczono sygnałów, nie wiemy czy makrocząsteczki są dopasowywane też, ani jak dobre jest dopasowanie.
6. Kwestia referensowania widm 1H MRS. Ponieważ rzeczywisty mózg ma inny skład niż „mózg” symulowany z zestawu bazowego, oba widma będą się różnić, głównie ze względu na obecność sygnałów makrocząsteczek i lipidów oraz potencjalne błędy fazowe, które mogą prowadzić do złej identyfikacji metabolitów, niedokładnego wyznaczania integralnych intensywności sygnałów i błędnego przypisania przesunięcia na skali ppm. Czy sprawdzano np. przyporządkowanie sygnału kreatyny/fosfokreatyny do pozycji ok. 3 ppm? Doktorantka podaje na str. 50 informację, że kreatyna/fosfokreatyna jest standardem do oznaczania stężenia. Byłabym ostrożna w takich deklaracjach.

#### Ocena końcowa

Jak wspomniałam w recenzji, realizacja tej pracy wymagała wielkiego wysiłku organizacyjnego oraz merytorycznego i analitycznego. Wszelkie uwagi krytyczne stanowią element dyskusji naukowej i nie umniejszają wartości rozprawy. Akceptuję przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską jako samodzielne i oryginalne dzieło naukowe.

Podjęta tematyka jest ważna i oryginalna z różnych punktów widzenia – przede wszystkim poszerza naszą wiedzę o funkcjonowaniu mózgu, ale też uświadamia, że na naszych oczach rodzi się nowe narzędzie badania dysfunkcji mózgu – w tym przypadku dysleksji – ale możliwości jego zastosowań, zarówno w neurologii, psychologii i psychiatrii, jest mnóstwo. Będą one prowadzić do spersonalizowanych technik diagnostyki dysfunkcji mózgowych. Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i może ubiegać się o nadanie stopnia doktora.

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. **Katarzyny Wasilewskiej** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* [Dz.U. 2024 poz. 1571 z póź. zm.].

W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marceliego Nenckiego PAN o dopuszczenie mgr inż. **Katarzyny Wasilewskiej** do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

15 grudnia 2025  
data sporządzenia recenzji

podpis recenzenta



Kraków, 19 grudzień 2025

Dr hab. Władysław Węglarz, Prof. IFJ PAN  
Zakład Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej  
Instytut Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Wasilewskiej  
z tytułem:  
„Functional Magnetic Resonance Spectroscopy (fMRS) Study on Reading-Related Metabolite  
Changes”,  
sporządzona w odpowiedzi na pismo  
Dyrektor Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN  
Prof. dr hab. Agnieszki Dobrzyń

### **Zakres tematyczny rozprawy**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska, przygotowana pod kierunkiem promotora Prof. dr hab. Katarzyny Jednoróg oraz promotora pomocniczego dr Bartosza Kossowskiego, została zrealizowana w Pracowni Neurobiologii Procesów Językowych, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN. Dotyczy badań porównujących zmiany stężeń metabolitów w mózgach osób dyslektycznych i zdrowych, podczas wykonywania zadań związanych z czytaniem. W jednej z najnowszych hipotez dotyczących mózgowych mechanizmów dysleksji – hipotezie szumu neuronalnego – zaproponowano, że podwyższone stężenie glutaminianu (Glu) względem stężenia kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), w lewym górnym zakręcie skroniowym (STS), zakłóca przetwarzanie sygnałów i utrudnia nabywanie umiejętności czytania. Dla sprawdzenia tej hipotezy, Doktorantka postanowiła zbadać zmiany stężenia Glu w obszarach mózgu zaangażowanych w czytanie, mianowicie w STS i w obszarze wzrokowej formy słów (VWFA), położonej w lewej korze skroniowo-potylicznej, oraz porównawczo w rejonie kontrolnym, w przyśrodkowej korze przedczołowej (mPFC). W celu wykonania tych badań, wykorzystwała funkcjonalną spektroskopię rezonansu magnetycznego (fMRS), stosunkowo nową, nieinwazyjną technikę, pozwalającą wyznaczyć dynamiczne zmiany poziomu metabolitów w warunkach *in vivo*. Technika ta oprócz dynamicznego pomiaru widm MRS wymaga uwzględnienia korekcji efektu BOLD. Nowatorskość zaplanowanych i przeprowadzonych badań podkreśla fakt że, wcześniej nie zastosowano techniki fMRS do oceny poziomu metabolitów w trakcie czytania. Opisane w rozprawie badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem dwu przedklinicznych tomografów MR, pracujących w polu magnetycznym, odpowiednio 7T oraz 3T. Ze względu na trudną lokalizację VWFA w obszarze narażonym na



niejednorodności pola magnetycznego, nie udało się przeprowadzić wiarygodnej analizy dla tego regionu. Z kolei w STS odpowiedzi Glu na bodźce związane z czytaniem były zróżnicowane. Efekty były bardziej widoczne u kobiet, ale w dużym stopniu zależały od zastosowania korekcji BOLD i różniły się między skanerami 7T i 3T. Wyniki nie wykazały wyższego poziomu Glu w lewym STS u osób z dysleksją jak przewidziano w hipotezie szumu neuronalnego. Ponadto, zmiany stężenia Glu zaobserwowano nie tylko w obszarze związanym z czytaniem, lecz także w użytych do porównania obszarze mPFC. Ze względu na zmienność wyników w zależności od płci, grupy, obszaru mózgu, rodzaju bodźca i skanera nie udało się ustalić funkcji zmian Glu w czasie. Zaobserwowano również, że płeć, wiek i skład tkankowy analizowanego woksela znacząco wpływały na poziom Glu. Niektóre parametry jakości widma były lepsze przy użyciu skanera 7T, jednak ogólne korzyści w porównaniu do 3T były niejednoznaczne i zależały od analizowanego obszaru mózgu.

Badania przedstawione w rozprawie zostały przeprowadzone i sfinansowane w ramach projektu OPUS, po uzyskaniu akceptacji ze strony właściwej komisji z Wydziału Psychologii Uniwersytetu Warszawskiego.

### **Struktura rozprawy**

Rozprawa została zredagowana w języku angielskim, na 180 stronach. Zasadnicza treść poprzedzona jest Spisem Treści, Abstraktem w języku angielskim i Streszczeniem w języku polskim oraz listą używanych skrótów. Została podzielona na sześć głównych rozdziałów: Wstęp, Oryginalne Badania, Wyniki, Dyskusja oraz Podsumowanie i Konkluzje. Na końcu rozprawy zamieszczono listę 183 odnośników literaturowych, oraz Listę publikacji powstałych z udziałem Doktorantki, obejmujących dwa artykuły naukowe, a także 3 ustne i 2 posterowe prezentacje konferencyjne.

We Wstępie, w pierwszej części Autorka opisała fizyczne podstawy spektroskopii zlokalizowanej magnetycznego rezonansu na jądрах wodoru ( $^1\text{H}$ -MRS), scharakteryzowała dostępne pakiety oprogramowania do analizy widm MRS oraz przybliżyła metodologię funkcjonalnej spektroskopii magnetycznego rezonansu. W drugiej części, opisała neuronalne podstawy czytania oraz dysleksji, zróżnicowanie występowania przejawów dysleksji w zależności od płci, dotychczasowe badania dysleksji z wykorzystaniem MRS oraz dotychczasową ewidencję badawczą związaną z hipotezą szumu neuronalnego. Rozdział ten zakończony jest krótkim podsumowaniem.

Na początku rozdziału drugiego zatytułowanego Autorka przedstawiła szczegółowe cele rozprawy, obejmujące:



- zbadanie, czy stężenie Glu zmienia się w odpowiedzi na bodźce wzrokowe związane z czytaniem w regionach mózgu wrażliwych na język (to jest w STS i VWFA),
- przetestowanie hipotezy o szumie neuronalnym, która przewiduje, że osoby z dysleksją wykazują wyższy poziom Glu w STS w porównaniu z typowymi czytelnikami,
- określenie, czy efekty te są specyficzne dla obszarów mózgu związanych z czytaniem (VWFA i STS), czy też można je zaobserwować w mPFC, która nie jest bezpośrednio zaangażowana w czytanie,
- zbadanie czasowej dynamiki zmian stężenia Glu po stymulacji,
- porównanie jakości danych uzyskanych na dwóch różnych systemach rezonansu magnetycznego, to jest 3T i 7T.

W kolejnym podrozdziale, poświęconym opisowi metodologii eksperymentu, Doktorantka w pierwszej kolejności opisała dobór uczestników oraz ogólny schemat przebiegu pomiarów, obejmujący sesję behawioralną mającą na celu określenie poziomu umiejętności czytania oraz sesję obrazowania funkcjonalnego (fMRI), mającą na celu określenie położenia obszarów aktywnych w mózgu każdego z uczestników. Następnie bardziej szczegółowo omówiła sposób realizacji pomiarów fMRI i fMRS oraz kolejnych etapów przetwarzania i analizy danych fMRS, prowadzących do otrzymania wartości stężeń metabolitów w poszczególnych obszarach mózgu, grupach badawczych i okresach czasowych po stymulacji. W ostatnim podrozdziale krótko opisała metodologię analizy statystycznej otrzymanych wyników.

Najobszerniejszy, trzeci rozdział zawiera wyniki badań uzyskanych dla skanerów 7T i 3T, uporządkowanych w jednolity sposób, choć zamieszczonych w dwu osobnych podrozdziałach. W każdym przypadku Doktorantka zamieściła wyniki statystyk opisowych uczestników badań oraz wyniki testów językowych przeprowadzonych podczas badania fMRI, a przede wszystkim szczegółowe wyniki analizy eksperymentów fMRS, z uwzględnieniem rodzaju stymulacji, opóźnienia w stosunku do czasu wystąpienia stymulacji oraz przy uwzględnieniu dynamicznie uśrednionej analizy danych. Dla każdego skanera, przeanalizowała też jakość uzyskanych danych. Dane umieściła w formie tabel, a przypadki statystycznie istotnych różnic zilustrowała na wykresach. W trzecim podrozdziale zamieściła wyniki eksperymentu porównującego jakość danych uzyskanych w polu 7T i 3T, porównując parametry takie jak szerokość linii, stosunek sygnału do szumu (SNR) oraz dolną granicę Cramera-Rao (%CRLB).

Rozdział czwarty zawiera dyskusję uzyskanych wyników, pogrupowaną w kolejnych podrozdziałach, zgodnie z wymienionymi wcześniej szczegółowymi celami rozprawy. Dodatkowo, w osobnych podrozdziałach, Doktorantka bardzo szczegółowo przedyskutowała istotne czynniki i zależności wpływające na wyniki uzyskiwane w badaniach fMRS oraz ograniczenia przeprowadzonych eksperymentów w kontekście dostępnej wiedzy literaturowej.

W ostatnim krótkim rozdziale 5, Doktorantka zamieściła podsumowanie i konkluzje.

### **Ogólna ocena rozprawy**

Informacje zamieszczone przez Doktorantkę we Wstępie wskazują że posiadała ona ogólną wiedzę teoretyczną o podstawach fizycznych spektroskopii zlokalizowanej  $^1\text{H}$ -MRS, jak również w zakresie znajomości sekwencji impulsowych służących do uzyskiwania widm, specjalistycznego oprogramowania do ich analizy. Ponadto orientuje się w najnowszych trendach rozwoju tej techniki pomiarowej, w szczególności w zakresie fMRS, którą wykorzystwała w swoich badaniach. Zdaje sobie również sprawę z potencjalnych korzyści oraz wyzwań związanych z wykorzystaniem wysokopólowych skanerów MRI do badań MRS mózgu. Ta część rozprawy, zredagowana zwięźle ale rzeczowo, z właściwymi odnośnikami literaturowymi, może służyć jako użyteczne kompendium wiedzy dla osób zainteresowanych wykorzystaniem technik  $^1\text{H}$ -MRS w swoich badaniach. Również część Wstępu poświęcona dysleksji jest zredagowana czytelnie i we właściwy sposób wprowadza w zagadnienia związane z hipotezą szumu neuronalnego, jak również, we wcześniejsze badania MRS poziomu metabolitów u osób dyslektycznych.

Sformułowania celów badawczych jak również opis schematu pomiarów oraz analizy danych pomiarowych, a także sposób i zakres prezentacji wyników pomiarowych, zamieszczone w kolejnych dwu rozdziałach, wskazują na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz dobrego opanowania stosowanej metodologii badawczej, związanej z funkcjonalną spektroskopią magnetyczno-rezonansową. Obszerna dyskusja uzyskanych wyników, przeprowadzona w kontekście innych doniesień literaturowych w obszarze MRS, świadczy o umiejętności wyciągania wniosków i realistycznej oceny wyników badań własnych.

Oryginalnym problemem badawczym postawionym w rozprawie było rozstrzygnięcia charakteru zmian poziomu Glu podczas zadań związanych z czytaniem u osób dyslektycznych, w kontekście hipotezy szumu neuronalnego. W tym kontekście, po przeanalizowaniu wszystkich zebranych danych, Doktorantka stwierdziła pewne



prawidłowości co do charakteru zmian poziomu Glu w STS, przede wszystkim zależność od płci oraz wieku, jednak nie stwierdziła różnic międzygrupowych potwierdzających hipotezę szumu neuronalnego. Ponadto odpowiedzi Glu zaobserwowane zostały również w obszarze mPFR, który w założeniu był obszarem kontrolnym. Z kolei w obszarze VWFA, bardzo istotnym z punktu widzenia czytania, nie było możliwości wyznaczenia odpowiedzi Glu ze względu na niską jakość danych. Nie udało się również wyznaczyć spójnej czasowej funkcji odpowiedzi Glu. Porównując parametry widm uzyskanych w polu 7T i 3T, Doktorantka uzyskiwała lepsze (niższe) wartości %CRLB w pierwszym przypadku, ale szerokość linii była lepsza w drugim.

Oceniając oryginalność osiągnięć przedstawionych w rozprawie, należy podkreślić że technika fMRS jest relatywnie nowa, dotychczas nie jest powszechnie stosowana, a jej wcześniejsze wykorzystanie w zakresie objętym niniejszą rozprawą nie jest (wg. aktualnej wiedzy recenzenta) udokumentowane w literaturze. W związku z tym nowe wyniki, uzyskane w dobrze zaprojektowanych trzech grupach eksperymentów, mają niezaprzeczalną wartość poznawczą, nawet jeśli nie w każdym przypadku dały wprost jednoznaczne odpowiedzi na oryginalnie sformułowane w rozprawie pytania.

### **Uwagi do rozprawy**

O ile moja ocena rozprawy jako całości jest pozytywna, mam pewne uwagi do przedyskutowania podczas obrony. Jak można stwierdzić studiując rozdział poświęcony wynikom, obserwowana jest w nich duża zmienność, skutkująca relatywnie niewielką liczbą statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami czy rodzajem stymulacji. Ponadto pomiędzy wynikami uzyskanymi dla 3T i 7T jest sporo niekonsystencji, zaś brak poprawy jakości danych w kontekście wyznaczenia poziomu Glu, przy pomiarach w wyższym polu, pomimo lepszego %CRLB, jest zastanawiający. W Dyskusji Autorka obszernie i kompetentnie wyspecyfikowała szereg możliwych powodów takiego stanu rzeczy, jednak nie wskazała które z nich, według niej były najistotniejsze w omówionych w rozprawie badaniach. Jak się wydaje można je podzielić na przyczyny techniczne leżące po stronie aparatury (jak np. niewystarczająca korekta pola przy 7T, nieoptymalny dobór parametrów sekwencji impulsowej, zbyt niski SNR skutkujący niską czułością, etc...), sposobu analizy widm (np. dobór parametrów dopasowania, "basis sets", linii bazowej, etc...) jak również po stronie badanego "obiektu" i charakteru aktywności (np. niski poziom odpowiedzi Glu, niemożliwy do dokładnego wyznaczenia) czy złożoności procesu pozyskiwania danych (np. dane fMRI do korekty pozyskiwane były w dniu poprzedzającym właściwy pomiar fMRS, grupy badane na

7T i 3T nie były tożsame, protokół pomiarowy był zbyt złożony, etc...). W tym kontekście, mam pytanie czy Autorka ma pogląd lub wiedzę które z tych potencjalnych problemów są w przypadku prowadzonych badań najbardziej istotne, które z nich są możliwe do rozwiązania i ewentualnie jakie kroki należałoby w tym celu podjąć, aby w kolejnych analogicznych badaniach uzyskać wyniki o lepszej istotności?

W przypadku analizy widm ze skanerów 7T i 3T zastosowano różne "basis sets" (odpowiednio zawierające 27 i 18 metabolitów). Czy w związku z tym że SNR oraz szerokość linii wyznaczona w ramach QC dla 7T generalnie nie były znacząco lepsze niż dla 3T, dopasowanie 27 zamiast 18 metabolitów jest uzasadnione? Czy nie prowadzi to do zwiększenia niedokładności dla wyznaczonych metabolitów?

Widma bazowe na str. 48 i 49 (Fig. 8 i Fig. 9) są mało czytelne. Dodatkowo proszę o wyjaśnienie co dokładnie zostało przedstawione na rys. 9, ponieważ zarówno opis w tekście jak i podpis pod rysunkiem są niejasne.

Na rysunkach prezentujących zmierzone widma (np. na str. 57, 59) wykresy residuów (nad widmem) mają niewłaściwie dobraną skalę co powoduje że są w praktyce bezużyteczne w ocenie jakości dopasowania.

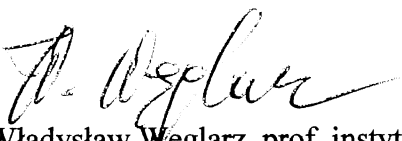
Zauważyłem też drobne błędy edycyjne:

S52 L10 błąd w tekście

S111 Fig.29 błędny podpis

Pomimo tych uwag, oceniam rozprawę pozytywnie, ze względu na oryginalność podjętych badań, sposób ich przeprowadzenia i kompetentne przedstawienie oraz przedyskutowanie wyników.

Reasumując, stwierdzam zatem że przedstawiona przez mgr inż. Katarzynę Wasilewską rozprawa doktorska zatytułowana „Functional Magnetic Resonance Spectroscopy (fMRS) Study on Reading-Related Metabolite Changes” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024, poz. 1571. z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej o dopuszczeniu mgr inż. Katarzyny Wasilewskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

  
Dr hab. Władysław Węglarz, prof. instytutu