

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

Јелена М. Михаиловић

**Дифузијски наглашено снимање и
магнетно-резонантна спектроскопија у
разликовању тумора мозга**

докторска дисертација

Београд, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Jelena M. Mihailović

**Diffusion weighted imaging and
magnetic resonance-spectroscopy in
differentiation of brain tumors**

doctoral dissertation

Belgrade, 2017.

Ментор:

др Марко Даковић, доцент

Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

Чланови комисије:

др Марко Даковић, доцент

Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

др Милош Мојовић, ванредни професор

Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

др Катарина Качар, научни сарадник

Медицински факултет, Универзитет у Београду

Датум одбране докторске тезе: _____

Захвалница

Ова докторска дисертација је реализована у Центру за радиологију и магнетну резонанцију Клиничког Центра Србије и Одељењу радиолошке дијагностике, Институт за онкологију и радиологију Србије у Београду, под руководством др Марка Даковића.

Захваљујем свом ментору доценту др Марку Даковићу, на упознавању са клиничком применом магнетне резонанције, пренешеном знању и на помоћи у раду, дискусијама резултата и свим фазама израде ове докторске дисертације.

Велику захвалност дугујем др Весни Вуковић за указано поверење и увођење у свет неуро науке, као и за сво несебично пренешено знање. Такође се захваљујем свим колегама са Института за онкологију и радиологију Србије, Одељење радиолошке дијагностике на пруженој помоћи у раду, на занимљивим научним и „ненаучним“ дискусијама и подели лепих и тешких тренутака током рада.

Огромну захвалност дугујем др Ивици Меденици и др Александру Војводићу на подршци и помоћи у реализацији ове докторске дисертације.

Захваљујем својој породици на љубави, стрпљењу и толеранцији.

Велику захвалност дугујем свом ујка Миши који ме је подршком и саветима подстицао и омогућио да стечено знање даље надограђујем.

Наслов докторске дисертације:

Дифузијски наглашено снимање и магнетно – резонантна спектроскопија у разликовању тумора мозга

Резиме

Тумори који захватају центри нервни систем, првенствено ендокранијум, представљају посебан изазов у дијагностици магнетном резонанцијом. Класични преглед овом техником често не даје довољно информација неопходних, како за њихово међусобно разликовање, тако и за разликовање од других не-туморских патологија. Техника магнетне резонанције позната као дифузијски наглашено снимање омогућава праћење кретања молекула воде и њихову дифузију на микроскопском нивоу. Слободно кретање молекула је отежано због интеракције са другим молекулима и ћелијским мембранама, па абнормалности које се јављају могу указати на промене микроструктуре на ћелијском нивоу, последично мењајући карактеристике дифузије што се може квантификовати мерењем вредности привидног дифузионог коефицијента. Како класична анализа дифузијских слика у градацији тумора зависи од вештине оператора и његове објективности, пожељно је увођење полуаутоматских/аутоматских техника за одређивање региона од интереса, као што су независне технике сегментације и класификације тумора. Применом полуаутоматског алгоритма сегментације („*fuzzy C means single channel*”) са унапред дефинисаним бројем кластера, добијају се кластери који одговарају одређеној компоненти тумора. Хистограми вредности DWI сигнала за читаву запремину тумора, али и за сваки кластер омогућавају добијање параметара који карактеришу хомогеност у датом кластеру и његов удео у целом тумору. Анализа хистограма за компоненту тумора која је дефинисана као солидни део и припада првом кластеру, код свих група астроцитома показује нормалну расподелу без присуства других пикова. Вредности привидног дифузионог коефицијента, ширине линије и висине пика у овом кластеру имају опадајући тренд. Према добијеним вредностима је могуће разликовати астроцитоме различитог степена малигности са сензитивношћу и специфичношћу преко 85%. У трећем кластеру је успешно издвојена компонента која одговара зони едема у случају дифузних и анапластичних тумора, али је

такође показана и изузетна хетерогеност глиобластома што се огледа у изгледу њихових хистограма. Наиме, померање хистограма ка нижим вредностима указује на присуство туморских ћелија. Како је у анализи обухваћен цео тумор, али и добијени кластери који су садржали само одређену компоненту тумора утицај субјективности који је присутан приликом ручног одабира региона од интереса је избегнут чиме се значајно смањило утицај људког фактора као извора грешке.

Код већине патолошких процеса, промене метаболизма претходе анатомским променама током прогресије болести и терапије што се може детектовати методом магнетно-резонантне спектроскопије која омогућава неинвазивну евалуацију метаболита мозга *in vivo*. Истраживање је посебно усмерено на разумевање механизма којим глијале ћелије утичу на ћелијску физиологију и локално микроокружење тумора чиме се олакшава раст тумора. У ту сврху је испитивано присуство/одсуство и концентрација метаболита глутамата/глутамин, миоинозитола и глицина као потенцијалних биомаркера у дијагностиковању и разликовању, прогнози болести и праћењу одговора на терапију астроцитних тумора. Анализа спектра показала је да према концентрацијама; mI, Gly и Glx астроцитни тумори различитих градуса могу бити класификовани са успешношћу од 94.6%. Уколико се изврши класификација на основу појединачних метаболита успешност класификације се знатно смањује. Добијени резултати су такође показали да се глицин јавља код високоградусних тумора, док код нискоградусних тумора нису запажене значајне концентрације овог метаболита. Резистенција глиобластома на постојећи хемиотерапеутик може бити повезана са хетерогеношћу али и генетским/епигенетским променама. Хиперметилација промотора доводи до утишавања гена који је одговоран за ензим Об-гуанин метил трансферазе који спречава дејство хемиотерапеутика. У овој докторској дисертацији је примењена фрактална анализа у циљу разликовања подтипова глиобластома. Статистички значајна разлика је добијена за вредности fA неметилисаних глиобластома у односу на вредности добијене за метилисане глиобластоме.

Кључне речи: глијални тумори, дифузијски наглашено снимање, магнетно-резонантна спектроскопија, мултиваријантна анализа, метилација, фрактална анализа

Научна област: Физичка хемија

Ужа научна област: Биофизичка хемија

УДК

Title of doctoral dissertation:

Diffusion weighted imaging and magnetic resonance spectroscopy in differentiation of brain tumors

Abstract

Central nervous system tumours, especially brain, make their diagnostics and differentiation by use of magnetic resonance imaging difficult. Usually it doesn't give enough information for their differentiation. Diffusion weighted imaging is an advanced magnetic resonance imaging technique which provides unique information about microstructure of tissues by probing self-diffusion of water molecules. Microscopic movements of water molecules is mostly affected by the presence of cell membranes, therefore, any alteration in cell density or size will affect water diffusion in tissue and the extent of hindrance can be quantified by apparent diffusion coefficient. As diffusion weighted imaging efficacy depends on human factors, it is important to establish semi-automated techniques for segmentation and classification. The algorithm of *Fuzzy C means single channel* requires knowing the number of classes in advance, based on histology appearance of astrocytomas and generates classes with defined tumor component. Histograms which represent number of voxels in function of signal intensities for whole tumor volume and each cluster gives three parameters: apparent diffusion coefficient, full width at half maximum - FWHM and peak height. For solid part of tumor, first cluster histogram analysis in all astrocytomas shows normal distribution without other peaks. Apparent diffusion coefficient, FWHM and peak height in this cluster had decreased trendline. Based on these measures it was possible to differentiate different grades of astrocytomas with sensitivity and specificity over 85%. In third cluster we distinguished edema in case of diffuse and anaplastic astrocytomas, also we showed extremely heterogeneity of glioblastomas. Namely, histogram movement in left reveals presence of tumor cells. Whole tumor and each cluster analysis together avoid subjectivity during choice of region of interest which decrease human factor as source of mistake.

In the most pathological processes metabolism alterations happen before anatomical changes during disease progression and therapy which may be evaluated by magnetic

resonance spectroscopy. It allows us noninvasive metabolite evaluation *in vivo*. Research is directed toward understanding of mechanism which glial cells affect physiology and tumor local microenvironment mitigating tumor growth. In that purpose we investigate presence/absence and metabolite concentration; glutamate/glutamine, myoinositol and glycine as potential biomarkers in diagnosis, differentiation, disease prediction and therapy. Analysis of spectras showed efficacy of 94.6% in classification of different astrocytoma grades based on all three metabolites. If classification was done by each one efficacy is much lower. Also, glycine peak was present only in high grade astrocytomas. The resistance of glioblastoma multiforme to chemotherapy can be attributed by pronounced structural heterogeneity and numerous genetic/epigenetic alterations. The hypermethylation of promoter region causes silencing of the gene that encodes O6-guanine methyl transferase, the enzyme that interferes the action of chemotherapeutic agents. In this study we employed fractal analysis of magnetic resonance images in order to distinguish subtype of glioblastomas. Non-methylated GBMs showed significantly higher fA values compared to methylated ones.

Key words: glial tumors, diffusion weighted imaging, magnetic resonance spectroscopy, multivariate analysis, methylation, fractal analysis

Scientific field: Physical chemistry

Field of research: Biophysical chemistry

UDK

Садржај

1.	Увод	1
2.	Циљ рада	3
3.	Теоријски део	4
3.1	Интракранијални тумори	4
3.1.1	Астроцитоми-молекуларни механизми настанка	6
3.2	Нуклеарна магнетна резонанција	8
3.2.1	Принцип рада нуклеарне магнетне резонанције	8
3.2.2	Механизми контраста у МРИ	18
3.2.2.1	T ₁ контраст	18
3.2.2.2	T ₂ контраст	19
3.2.2.3	Протонска густина (<i>Proton density-PD</i>)	20
3.3	Дифузијски наглашено снимање	21
3.3.1	Мерење дифузије у ткиву	23
3.2.2	Привидни дифузиони коефицијент	25
3.2.3	DWI у дијагностици и диференцијацији тумора	26
3.4	Магнетно-резонантна спектроскопија	29
3.4.1	Хемијски померај	29
3.4.2	Спин-спин спрезање	30
3.5	<i>In vivo</i> протонска магнетно-резонантна спектроскопија	33
3.5.1	Технике локализације	33
3.5.1.1	Спектроскопија из једног воксела	33
3.5.1.2	Спектроскопија из више воксела	36
3.5.2	Утицај избора времена еха на изглед спектра	36
3.5.3	Метаболити у протонском МР спектру	37
3.5.3.1	Н ацетил аспартата (NAA)	38
3.5.3.2	Креатин	39
3.5.3.3	Холин	39
3.5.3.4	Глутамат/глутамин	41
3.5.3.5	Миоинозитол	42
3.5.3.6	Лактат	42
3.5.3.7	Аминокиселине	44
3.5.3.8	Макромолекули	44
3.5.4	Магнетно-резонантна спектроскопија у разликовању тумора мозга	45
3.6	Мултиваријантне методе сегментације слике	48
3.6.1	Сегментација кластеризацијом	48
3.7	Линеарна дискриминантна анализа	49
3.8	Фрактална анализа	50
4.	Експериментални део	54
4.1	Материјали и методе	54
4.1.1	Центри у којима је реализована докторска дисертација	54
4.1.2	Испитаници	54
4.1.3	МРИ снимање	55
4.1.3.1	Хистограмска анализа ADC мапа	59

4.1.3.2	Хистограмска анализа на сегментираним ADC снимцима	61
4.1.3.3	Анализа МР спектра и праћење тераписјког одговора глиобластома	62
4.1.4	Субдиференцијација глиобластома	63
4.1.4.1	Фрактална анализа у одређивању метилационог статуса глиобластома	63
5.	Резултати	65
5.1	Дифузијски наглашено снимање	65
5.1.1	Анализа локалних хистограма ADC мапа	66
5.1.2	Вредности ADC, FWHM и висине пика за различите градусе тумора у кластеру 1	70
5.1.3	Вредности ADC, FWHM и висине пика за различите градусе тумора у кластеру 2	78
5.1.4	Вредности ADC, FWHM и висине пика за различите градусе тумора у кластеру 3	85
5.1.5	Вредности ADC, FWHM и висине пика за глиобластом у кластеру 4	91
5.1.6	Удели различитих компонената у односу на читаву запремину тумора	92
5.1.7	Вредности ADC, FWHM и висине пика за прогресију дифузног у анапластични астроцитом добијене кластерском анализом	93
5.2	Магнетно-резонантна спектроскопија и праћење терапијског одговора глиобластома	96
5.3	Субдиференцијација подтипова глиобластома	103
5.3.1	Фрактална анализа у одређивању метилационог статуса глиобластома	103
6.	Дискусија	105
7.	Закључци	122
8.	Литература	125
9.	Биографија	147

1. Увод

Глиоми су најчешћи интракранијални тумори и потичу од генетских/епигенетских алтерација у најбројнијим можданим ћелијама - глијалним ћелијама, које у нормалном стању обезбеђују подршку нервним влакнима, одржавају хомеостазу у мозгу и генеришу мијелински омотач [1,2,3]. Ови тумори се даље деле на основу типа глијалних ћелија од којих воде порекло: астроцитоме (од астроцита), олигодендроглиоме (олигодендроцити) и епендимоме (епендималне ћелије). Према Светској здравственој организацији (*World Health Organization - WHO*) астроцитоми¹ се, на основу хистолошких карактеристика, деле на четири класе² (градуса) од најмање (пилоцитични астроцитом), преко дифузног астроцитоме (градус II), анапластичног астроцитоме (градус III) до јако агресивног и најчешћег глиобластома мултиформе (*GBM*) [4].

За разлику од тумора који се могу наћи у другим деловима организма и који се грубо могу поделити на бенигне и малигне туморе, због осетљивости локализације и неуролошких симптома који их прате, мождани тумори се ретко могу описати првим епитетом [3]. Изузев у ретким случајевима, њихов третман укључује оперативни захват без или са применом хемотерапије и зрачне терапије. Који ће терапијски режим бити одабран зависи од степена агресивности тумора, његове локализације и процене степена угрожености околних анатомских и функционалних структура [5]. Стога радиолошка дијагностика представља незаменљив корак у преоперативној обради можданих тумора.

Снимање магнетном резонанцијом (*Magnetic Resonance Imaging – MRI*) је техника која представља главно оруђе у локализацији и карактеризацији можданих тумора [6]. За разлику од компјутеризоване томографије (*Computerized Tomography – CT*) која даје податке о анатомској позицији и васкулатури тумора, комплекснија зависност MRI сигнала од карактеристика ткива, омогућава бољу делинеацију ових патологија од околног ткива, њихове структуре и степена

¹ Као и остали глиоми

² У широкој употреби је појам „градус“ (eng. grade – степен, оцена)

инфилтрације здравог ткива [7]. Међутим, класични MRI у најбољем случају може послужити за приближну диференцијацију нискоградусних тумора, али не и појединачних типова тумора. Напредне технике као што су дифузијски наглашено снимање (*DWI*) и магнетно резонантна - спектроскопија код којих сигнал зависи од микроструктуре тумора, односно његов метаболизам само су делимично успеле у решавању овог задатка.

Један број студија [8-12] показује да се применом сложенијих облика анализе *DWI* слика и МР спектара, укључујући напредну статистичку и текстурну анализу могу значајно повећати сензитивности и специфичности диференцијације тумора, а у неким случајевима и разликовање њихових подтипова [13-20].

Циљ овог рада је да се применом техника сегментационе и анализе текстуре *DWI* слика добију параметри или комбинације параметара који ће омогућити диференцијацију можданих глиома. Поред тога, циљ је да се техникама мултиваријантне анализе детектују резонаније метаболита које могу помоћи у разрешавању овог дијагностичког проблема.

2. Циљ рада

Циљ докторске дисертације је изналажење нових алгоритама за анализу мапа добијених дифузијски наглашеним магнетно-резонантним снимањем у циљу поуздане локализације региона који одговарају хистолошки различитим деловима тумора. Такође, циљ је и проналажење адекватног дифузијског параметра или комбинације параметара који би омогућили клинички значајно разликовање можданих тумора.

За остваривање овог циља употребљен је комбиновани приступ који укључује сегментацију региона тумора на ADC мапама коришћењем кластерске анализе, као и хистограмска анализа локализованих сегмената. На овај начин у највећој могућој мери је редукована субјектиност у дефинисању региона од интереса, али и узета у обзир микрохетерогеност можданих тумора. Претпоставка је да би такав приступ могао довести до високо статистички значајног разликовања ових патологија.

Циљ другог дела тезе је да се помоћу магнетно-резонантне спектроскопије утврди улога и концентрација метаболита у односу на креатин, нарочито инхибиторних и ексцитаторних неуротрансмитера, у диференцијацији можданих тумора као и у одређивању потенцијала за малигну трансформацију нискоградусних тумора. На тај начин омогућила би се процена потенцијала одређеног типа тумора за малигну трансформацију. Даље, на бази МР спектра анализирана је могућност раздвајања подтипова можданих тумора који се разликују по терапијском одговору.

3. Теоријски део

3.1 Интракранијални тумори

Интракранијални тумори се по својим особинама знатно разликују у односу на туморе других органских система. Разлика доброћудних (бенигнух) и злоћудних (малигнух) интракранијалних тумора је мање изражена него код тумора других система, тако да и бенигни могу довести до смртог исхода или тешког неуролошког поремећаја. Врло ретко метастазирају ван нервног система, али су склони инфилтрацији околног ткива. Према литературним подацима, примарни интракранијални тумори чине око 2% свих малигнух болести и представљају трећи најчешћи узрок смрти од малигнух болести код људи од 15 до 34 године [1,2,3].

Светска Здравствена Организација је 1993. године објавила ревизију претходне класификације тумора ЦНС-а из 1979. године названу „*Хистолошка типизација тумора централног нервног система*“. Ревизија је донела значајне измене. Према овој класификацији, на основу биолошког потенцијала тумори су нумерички скалирани по малигности од бенигнух (1) до малигнух (4). Међутим, данас је прихваћена нова WHO класификација (2010. година) тако да је актуелна хистолошка дијагноза у директној корелацији са хистолошким градусом тумора [4].

Тумори који настају од ткива мозга су познатији као примарни тумори. Они су класификовани према типу ткива у којима настају [21]. Интракранијални тумори који се најчешће јављају су глиоми, који потичу од глијалних ћелија које осигуравају подршку нервним влакнима, одржавају хомеостазу у мозгу и одговорне су за синтезу мијелинског омотача. Постоји неколико класа глиома од којих су најчешћи астроцитоме који потичу од малих ћелија звездастог облика - астроцита. Астроцитоме чине хетерогену групу и међусобно се разликују према локацији, потенцијалу раста, морфолошким карактеристикама и клиничком току. Градација степена малигности је одређена на основу хистолошких карактеристика тумора:

- *Пилоцитични астроцитом* је тумор 1 степена, ниске целуларности, ниског пролиферативног потенцијала и митотске активности са ретком малигном трансформацијом [22]. Његову хистолошку грађу чини наизменична структура са биполарним “пилоидним” астроцитима и карактеристичном микроцистичном компонентом. Солидни део тумора садржи велики број капилара са нарушеном крвно-можданом баријером, што резултује продукцијом протеинског садржаја који и испуњава цистични део тумора [23,24]. Иако се сматра да су пилоцитични астроцити добро ограничени од околине, многи од ових тумора инфилтрирају околно ткиво, нарочито белу масу. Карактеришу се релативно великом могућношћу излечења након хируршке ресекције.

- *Дифузни астроцитом* је означен као тумор 2 степена. Умерено је целуларан и инфилтрише суседне анатомске структуре. Рецидив је чешћи након локалне терапије него код градуса 1. Теже ка прогресији у високоградусне астроцитоме [22]. Представља добро диферентовану, али инфилтративну неоплазму спорог раста. Макроскопске карактеристике дифузног астроcitoма се презентују као хомогена, добро ограничена, инфилтративна неоплазма, спорог раста, сиво пепељасте боје са минималном деструкцијом околног можданог ткива, тако да је основна архитектура можданог ткива око тумора очувана. На пресеку је чврсте, мекане или желатинозне грађе, мада се може наћи и цистична дегенерација [23,24]. Хистолошки, дифузни астроцитом се карактерише релативно униформном популацијом неопластичних астроцита у фибриларном матриксу, са минималним ћелијским и нуклеарним плеоморфизмом или атипичношћу. Митотска активност је незнатна, а постоје микроцистичне промене које су заједничка карактеристика свих варијанти градуса 2 астроcitoма. Туморске ћелије имају плеоморфно влакно, везикуларно једро са малим једарцетом и ћелијске наставке који формирају глијалну фибриларну позадину. Нема микроваскуларне пролиферације и некрозе [24].

- Астроцитом трећег градуса назива се *анапластични астроцитом*, агресиван тумор са повишеном целуларношћу, атипичношћу језгара, значајном митотском активношћу и инфилтрацијом околног ткива [22,23,24].

- Астроцитом четвртог градуса је *глиобластом мултиформе-ГБМ* високо целуларан тумор који ретко метастазира, али има мултицентрични карактер. Склони су некрози са преоперативном и постоперативном убрзаном прогресијом и лошом прогнозом. Клинички ток развоја симптома је кратак, свега неколико месеци [22]. Хистолошки градус показује корелацију са старошћу пацијената код одраслих. Лезије код старијих пацијената имају већу вероватноћу да буду високоградусни астроцитом. Фактори који корелирају са вишим градусом малигнитета су прстенасто повећање, изражено увећање туморске масе и интратуморска некроза. ГБМ широко инфилтришу здраво možдано ткиво. Увећање туморске лезије може бити солидно, у виду прстена или у виду нехомогене благе сателитске лезије на периферији масе које изгледају као грозд [23,24]. Макроскопски, подручја ГБМ су чврста и бела или мекана и жућкаста, док друга показују поља цистичне дегенерације и хеморагије. Тумор се може појавити као добро ограничен од околног ткива, али инфилтрација у здраво možдано ткиво увек постоји. Хистолошки, глиобластом има карактеристике сличне анапластичном астроцитому. Осим присутне изражене атипичности и митозе, овај тумор се одликује и присуством псевдопалисаде-зоне некрозе која је ограђена неопластичним ћелијама и васкуларном ендотелном пролиферацијом, где ћелије ендотела крвних судова формирају спирале [24].

3.1.1 Астроцитом-молекуларни механизми настанка

Астроцитом, као и остали тумори настају услед акумулације генетичких промена (тачкасте мутације, транслокације, амплификације и делеције) и епигенетских модификација, које мењају фенотип ћелија и утичу на регулацију бројних сигналних путева. Иако није могуће дефинисати тачан број и редослед промена током канцерогенезе, идентификовани су кључни гени одговорни за настанак и прогресију. Бројне разлике у генетичким променама, чак и у оквиру истог градуса тумора, указују на њихову изражену хетерогеност која је присутна и у оквиру различитих региона појединачних тумора, што је посебно изражено у хипоксичним регионима и регионима прекида крвно-мождане баријере [25].

Са становишта молекуларне патологије, дифузни астроцитом се карактерише инактивацијом мутације *p53* (*TP 53- tumor protein*) тумор супресор гена на хромозому *17p* и амплификација *PDGFR α* (*platelet-derived growth factor receptor α*) и *PDGFR β* (*platelet-derived growth factor receptor β*) гена (3-33%), као и губитак *p53* гена [26]. Анапластичне астроцитоме карактерише губитак *Rb* (*retinoblastoma*) гена који се јавља услед делеције хромозома *13q13* и инактивације тумор супресора *p16^{INK4A}/CDKN2A* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) у око 30% случајева детектована у око 50% узорака. Мутације *p53* гена су заступљене са истом фреквенцијом, док је амплификација *MDM2* (*murine double minute 2*) гена, одговорног за енкодирање Е3 убиквитин лигазе, који инактивира *p53* ген, детектована у 13% од 43% [27]. Губитак хромозома *22q* и амплификација *7q* региона је такође присутна код ових тумора али још увек нису познати гени који се налазе у овим регионима, као ни улога ових хромозомских аберација [28,29].

Најчешће измењени гени код ГБМ су *p53* (40%), *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) (37%) и *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) (30%). Генетичке промене карактеристичне за примарне и секундарне ГБМ имају различите механизме настанка [30,31]. Амплификација *EGFR* и *LOH 10q* (*Loss of heterozygosity*) региона на коме се налази и *PTEN* тумор супресор представљају главне промене у геномима примарних глиобластома, док су мутације *p53* гена основна карактеристика секундарних глиобластома [25]. Хиперметилација промотора *MGMT* (*O6-methylguanine-DNA methyltransferase*) гена се јавља и код примарних и код секундарних ГБМ и представља позитиван прогностички фактор у терапији ових тумора Темозоломидом [32]. Губитак хетерозиготности хромозома *10* представља најфреквентнију генетичку промену која се јавља са учесталашћу 60-80% у оба типа ГБМ, што указује на присуство бројних тумор супресора у овом региону. Неке од наведених генетичких промена директно доводе до прогресије глиома, док друге повећавају геномску нестабилност утичући на процесе поправке ДНК оштећења, ДНК репликацију и раздвајање хромозома током ћелијске деобе.

3.2 Нуклеарна магнетна резонанција

Нуклеарна магнетна резонанција (НМР) је феномен резонантне апсорпције електромагнетног зрачење одређене фреквенције од стране језгара чији је укупни нуклеарни спин различит од нуле и која се налазе у магнетном пољу. Постојање нуклеарне магнетне резонанције у кондензованој материји су 1946. год. независно открили *Bloch* [33] и *Purcell* [34] за шта су добили Нобелову награду 1952. године. Техника је првобитно била намењена изучавању физичких појава (спин, магнетизам и сл.), али је убрзо уочена њена применљивост и у другим областима.

Примену нуклеарне магнетне резонанције у медицини подстакла су два открића: *Damadian* [35] је 1972. године открио да постоји разлика између НМР релаксационих времена протона (језгра водоника) воде у нормалном ткиву и туморима, док је *Lauterburg* [36] 1973. године показао да се може добити слика њихове расподеле унутар биолошких система уз употребу градијената магнетног поља. Магнетна резонанција данас заузима посебно место у медицинској дијагностици јер омогућава неинвазивно добијање информација о анатомским структурама људског тела и евентуалним патолошким процесима те физиолошким и функционалним променама унутар који их прате

3.2.1 Принцип рада нуклеарне магнетне резонанције

Магнетни момент језгра је универзална особина хемијских елемената. Само језгра са парним бројем протона и неутрона немају магнетни момент (језгра ^4He , ^{12}C , ^{16}O). Ипак, за сваки елеменат са парним редним бројем може се наћи стабилан изотоп са непарним масеним бројем на основу кога се може детектовати НМР сигнал. Због велике распрострањености у људском телу и њиховог великог инхерентног магнетног момента ($\mu=24.42 \times 10^{-27} \text{JT}^{-1}$), протони чине скоро идеалан избор за извор сигнала у дијагностичкој примени. У рутинској примени данас се користе уређаји са магнетним пољима од 0.3 - 4.7 Тесла (Т), од којих су у најширој употреби МРИ са снагом поља 1.5 Т.

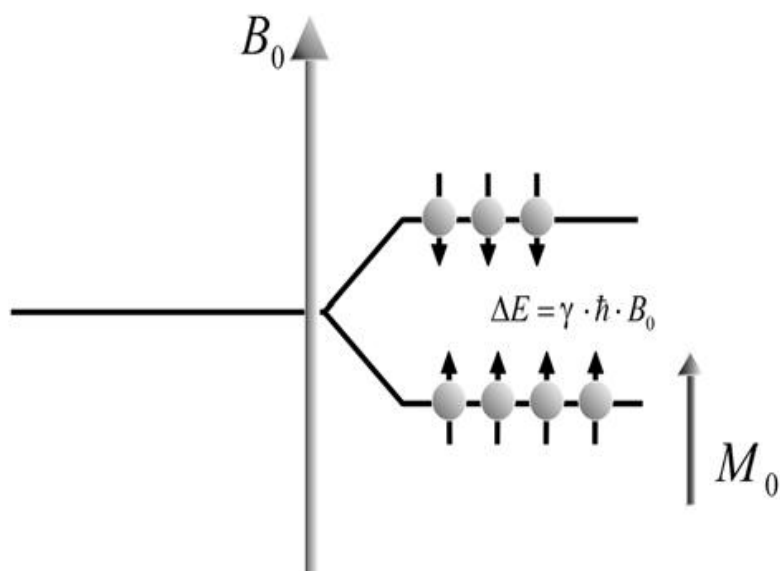
Нуклеарни спинови су у одсуству спољашњег магнетног поља хаотично оријентисани. У спољашњем магнетном пољу долази до оријентације спинских магнетних момената језгара, односно појаве макроскопске магнетизације **M**, која представља суму свих појединачних магнетних момената језгара μ_i истог типа (*једначина 1*) [37].

$$M = \sum_i \mu_i \quad (1)$$

Истовремено долази до цепања спинских енергетских нивоа, који су у одсуству магнетног поља дегенерисани, на ниже (α) и више (β) енергетско стање (*слика 1*) при чему је разлика у њиховим енергијама дата *једначином 2*.

$$E = \frac{h\nu}{2\pi} \quad (2)$$

Прерачуната у фреквенцију ова енергија одговара радиофреквентном опсегу електромагнетног спектра. Пошто је та енергија мања од термалне енергије честица kT на собној температури (на 25°C износи $\sim 10\text{-}20$ J), јасно је да ће популације тих нивоа бити сличне. Једноставном применом Болтцманове једначине могуће је утврдити да „вишак“ протона у нижем спинском стању на 1 T износи свега 1 у милион.



Слика 1. Енергетска дистрибуција спинова у спољашњем магнетном пољу

Динамика вектора магнетизације \mathbf{M} може се описати једначином 3

$$\frac{\partial \mathbf{M}}{\partial t} = \gamma \mathbf{M} \times \mathbf{B} \quad (3)$$

где су \mathbf{B} - јачина магнетног поља (Т), \mathbf{M} –резултујући магнетни момент и γ - жиромагнетни однос језгра (HzT^{-1}) који за протон износи 42.57 MHz/T .

Може се приметити да се вектор магнетизације померава истом правилу као и спински магнетни момент. Такође, може се извести закључак да уколико је $\mathbf{M} \parallel \mathbf{B}$, тада се вектор магнетизације не мења, јер нема деловања спољашњег момента силе.

У константном спољашњем магнетном пољу \mathbf{M} прецесира око правца спољашњег магнетног поља \mathbf{B} (обично се за њега узима z оса лабораторијског координатног система) које је дефинисано Ларморовом фреквенцијом ω_0 (једначина 4)

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (4)$$

где је B_0 - јачина статичког магнетног поља (Т)

Решавањем *једначине 3* по компонентама магнетизације M_x , M_y и M_z и комбиновањем са *једначином 4* добијамо *једначину 5*:

$$\begin{aligned} M_x(t) &= M_x(0) \cos \omega_0 t + M_y(0) \sin \omega_0 t \\ M_y(t) &= -M_x(0) \sin \omega_0 t + M_y(0) \cos \omega_0 t \\ M_z(t) &= M_z(0) \end{aligned} \quad (5)$$

Уколико се дуж x осе примени осцилирајуће магнетно поље B_1 које одговара пулсу електромагнетног зрачења из РФ опсега на фреквенцији која је једнака Ларморовој, могуће је инвертовати популације спинова и извести вектор магнетизације \mathbf{M} из „равнотежног положаја“, односно „оборити“ га ка ХУ равни (*слика 2*). Ако би поље B_1 било константно у времену, утицај на спинове би био занемарљив. Међутим, B_1 поље ротира око x осе фреквенцијом која је једнака Ларморовој и може се изразити *једначином 6*:

$$B_1(t) = B_1 \cos \omega_0 t \mathbf{i} - B_1 \sin \omega_0 t \mathbf{j} \quad (6)$$

која заменом у *једначину 5* даје:

$$\frac{\partial M_x}{\partial t} = \gamma[M_y B_0 + M_z B_1 \sin \omega_0 t]$$

$$\frac{\partial M_y}{\partial t} = \gamma[M_z B_1 \cos \omega_0 t - M_x B_0]$$
(7)

$$\frac{\partial M_z}{\partial t} = \gamma[-M_x B_1 \sin \omega_0 t - M_y B_1 \cos \omega_0 t]$$

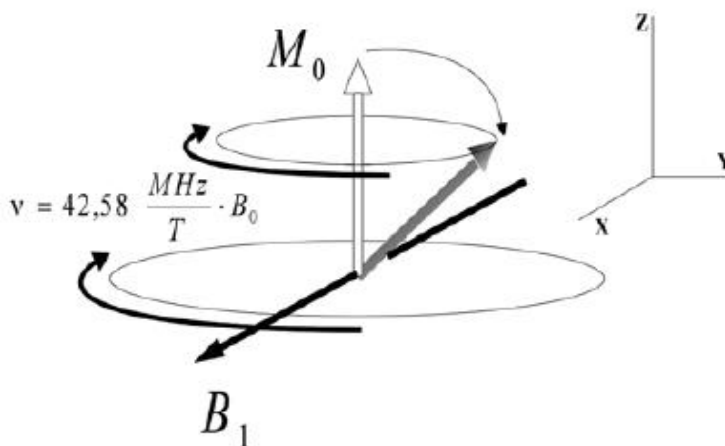
Решења једначине 7 за почетне услове $M(0)=M_0$ су:

$$M_x(t) = M_0 \sin \omega_1 t \sin \omega_0 t$$

$$M_y(t) = M_0 \sin \omega_1 t \cos \omega_0 t$$

$$M_z(t) = M_0 \cos \omega_1 t$$
(8)

где је $\omega_1 = \gamma B_1$.



Слика 2 Прецесија вектора магнетизације и обарање равни магнетизације под дејством поља B_1 .

По престанку пулса систем се враћа у равнотежно стање при чему долази до опадања трансверзалне M_{xy} и опоравка лонгитудиналне M_z компоненте вектора магнетизације (једначина 9):

$$\begin{aligned}\frac{\partial M_z}{\partial t} &= \frac{-(M_z - M_0)}{T_1} \\ \frac{\partial M_x}{\partial t} &= \frac{-M_x}{T_2} \\ \frac{\partial M_y}{\partial t} &= \frac{-M_y}{T_2}\end{aligned}\tag{9}$$

где су M_0 - средња вредност магнетизације у термодинамичкој равнотежи, T_1 -временска константа губитка енергије спинског система у интеракцијама са околином-спин-решетка релаксације или лонгитудиналне релаксације (*spin-lattice relaxation*) и T_2 -временска константа опадања трансверзалне компоненте магнетизације услед губитка фазне кохеренције међу спиновима (*spin-spin relaxation*), при чему је $T_2 < T_1$.

Ако једначину 9 уврстимо у једначину 5, добијамо једначину 10 која се, пратећи апликацију пулса трансформише у коначан облик *Bloch*-ових [33] једначина (једначина 11):

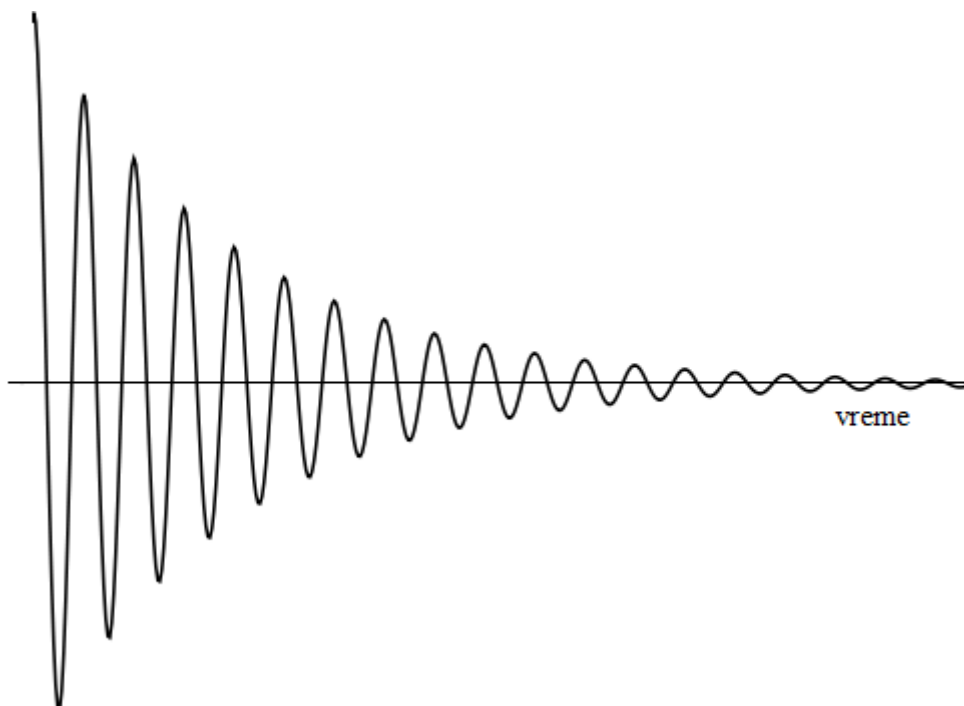
$$\begin{aligned}\frac{\partial M_x}{\partial t} &= \gamma M_y \left(B_0 - \frac{\omega}{\gamma} \right) - \frac{M_x}{T_2} \\ \frac{\partial M_y}{\partial t} &= \gamma M_z B_1 - \gamma M_x \left(B_0 - \frac{\omega}{\gamma} \right) - \frac{M_y}{T_2} \\ \frac{\partial M_z}{\partial t} &= -\gamma M_y B_1 - \frac{(M_z - M_0)}{T_1}\end{aligned}\tag{10}$$

$$\begin{aligned}
M_x(t) &= M_0 \sin \theta \sin(\omega_0 t) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \\
M_y(t) &= M_0 \sin \theta \cos(\omega_0 t) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \\
M_z(t) &= M_0 \left[1 - (1 - \cos \theta) \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)\right]
\end{aligned}
\tag{11}$$

Решења *Bloch*-ових [33] једначина су:

$$\begin{aligned}
M_x &= M_0 \exp\left[-\frac{t}{T_2} \cos(-\omega_0 t)\right] \\
M_y &= M_0 \exp\left[-\frac{t}{T_2} \sin(-\omega_0 t)\right] \\
M_z &= M_0 \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)\right]
\end{aligned}
\tag{12}$$

Повратак магнетизације у равнотежно стање генерише променљиву електричну струју у завојници која се налази у XY равни, при чему се добија сигнал распада слободне индукције (*free induction decay - FID*) (слика 3).



Слика 3 Сигнал распада слободне индукције у случају присуства једне спинске врсте у систему

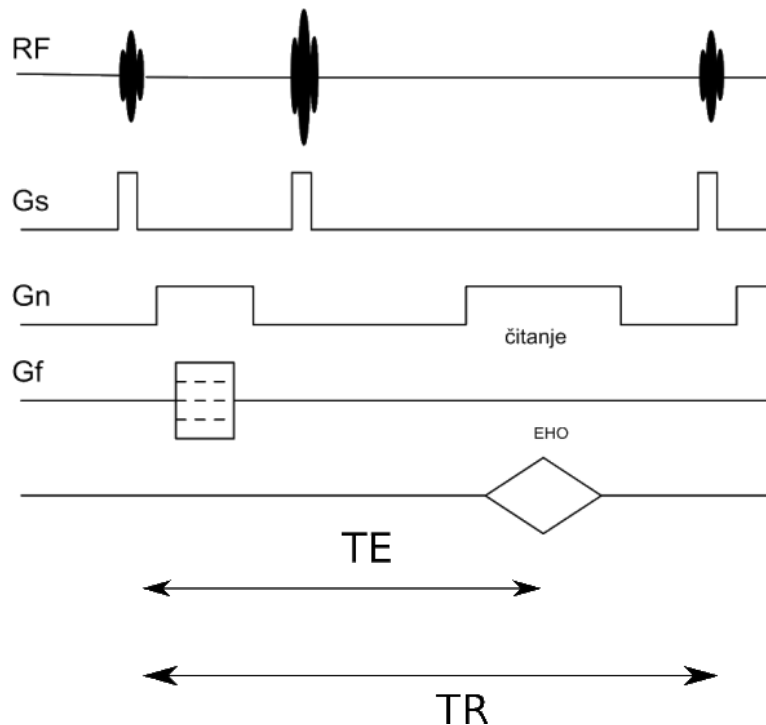
Временско понашање амплитуде овог сигнала дато је једначином 13:

$$M_x(t) = M_0 \cos[(\omega_0 - \omega)t + \varphi] e^{-t/T_2^*} \quad 13$$

Да би се из распада сигнала слободне индукције извукла информација о присутним спинским врстама у систему као и њиховом окружењу и концентрацији, неопходно је распад слободне индукције подврћи Фуријеовој трансформацији. Основна сврха овог поступка је превођење сигнала из временског домена у фреквенциони домен - т.ј. у НМР спектар.

Основни проблем у генерисању слике у магнетној резонанцији је проблем локализације сигнала односно утврђивање запреминског елемента из кога потиче. То се у савременим уређајима постиже помоћу посебне секвенце догађаја – временски уређене пулсне промене линеарних градијената магнетних поља дуж

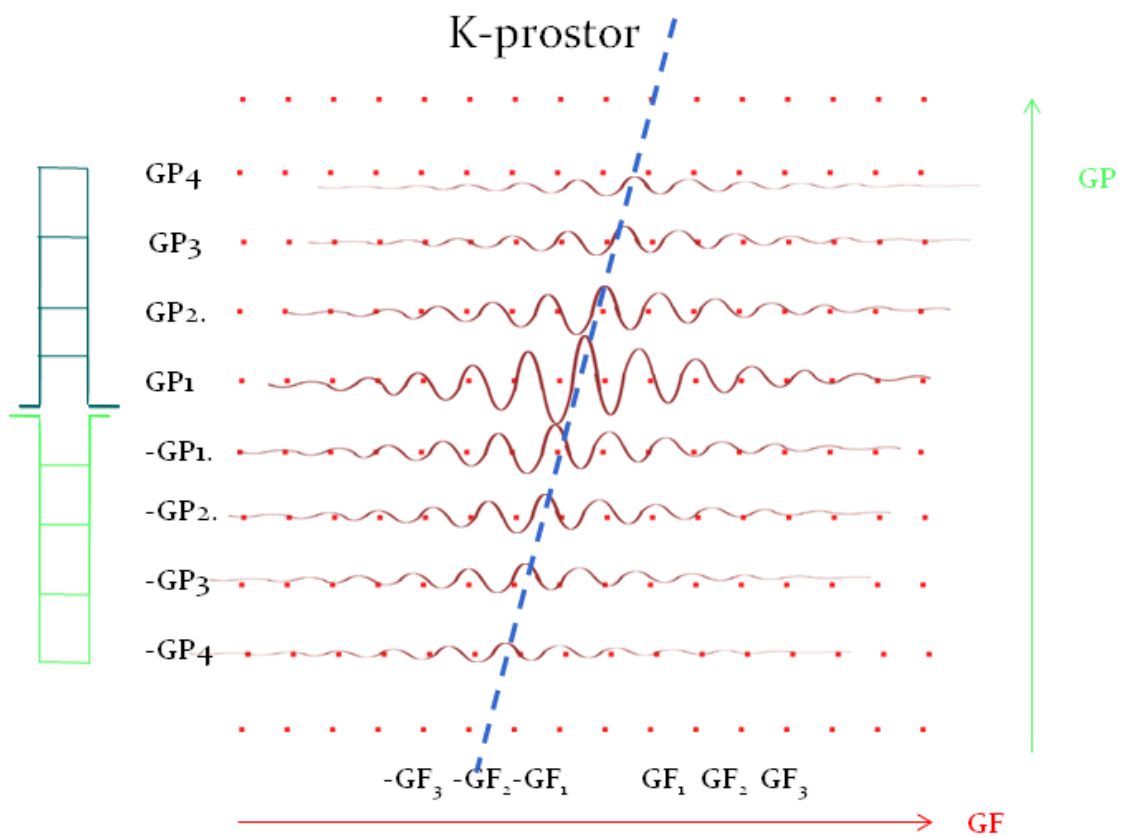
x, y и z оса, као и применом одговарајућег/их РФ пулса/ева. Типична спин ехо секвенција са назначеним карактеристичним временима и распоредом радиофреквентних и градијентних пулсева приказана је на *слици 4*. Спин ехо и његове варијанте су најчешће употребљаване секвенце у рутинским МРИ прегледима.



Слика 4. Класична спин ехо секвенција. Прва линија у секвенцији представља временски распоред РФ пулсева, док следеће три представљају дистрибуцију градијената пулсева. TE време представља временски интервал од првог пулса у секвенци до појаве максимума сигнала (односно еха у овом случају), док је TR временско растојање између две поновљене секвенције (односно у овом случају растојање између 90° пулсева). Пулс градијент избора пресека (Gs), фазно кодирајући (Gn) и фреквенционо кодирајући (Gf).

Пулс градијент избора пресека (Gs) заједно са РФ пулсем/вима одабира одређени пресек и одређује његов облик. Фазно кодирајући (Gn) и фреквенционо кодирајући (Gf) одређују позицију сигнала у равни датог пресека. Добијени сигнали се до Фуријеове трансформације складиште у виртуелном тзв. К-простору који представља фреквентно-фазну матрицу (*слика 5*). У сваком

тренутку када се добије сигнал након фазног и фреквенционог кодирања подаци се складиште у једној линији К простора. Поларност градијената одређује да ли ће позитивна или негативна страна К простора бити попуњена. Сваки елемент простора (пиксел) има јединствену комбинацију вредности фаза и фреквенција што рачунару омогућава да га смести у одеђени део простора. Након ФТ добија се слика изабраног пресека, при чему свака тачка на њој (пиксел) представља пројекцију укупног интензитета сигнала који потиче из елемента запремине (воксела).



Слика 5 К простор.

3.2.2 Механизми контраста у МРИ

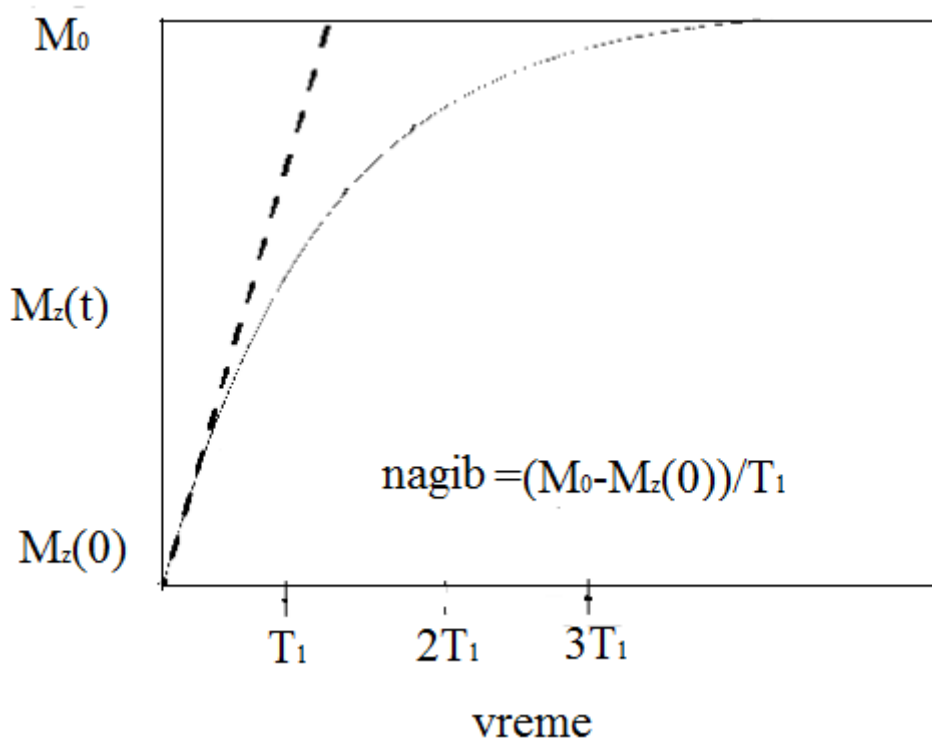
Под контрастом на МРИ слици подразумева се постојање делова слике са високим (светло) и ниским интензитетом (тамно). Висок интензитет у неком делу слике потиче од велике трансверзалне компоненте магнетизације која у РФ завојници индукује струју - МР сигнал. Контраст слике се подешава преко спољашњих параметара који су контролисани од стране оператера. Од параметара ткива који утичу на контраст слике могу се издвојити: T_1 релаксација, T_2 релаксација (*једначина 14*), густина протона, дифузија, проток и сусцептибилност.

$$S = N(1 - e^{-TR/T_1})e^{-TE/T_2} \quad 14$$

где је N -концентрација протона у датом узорку, TR -време репетиције и TE -време еха су параметри аквизиције сигнала, T_1 и T_2 временске константе опадања лонгитудиналне и трансверзалне компоненте магнетизације.

3.2.2.1 T_1 контраст

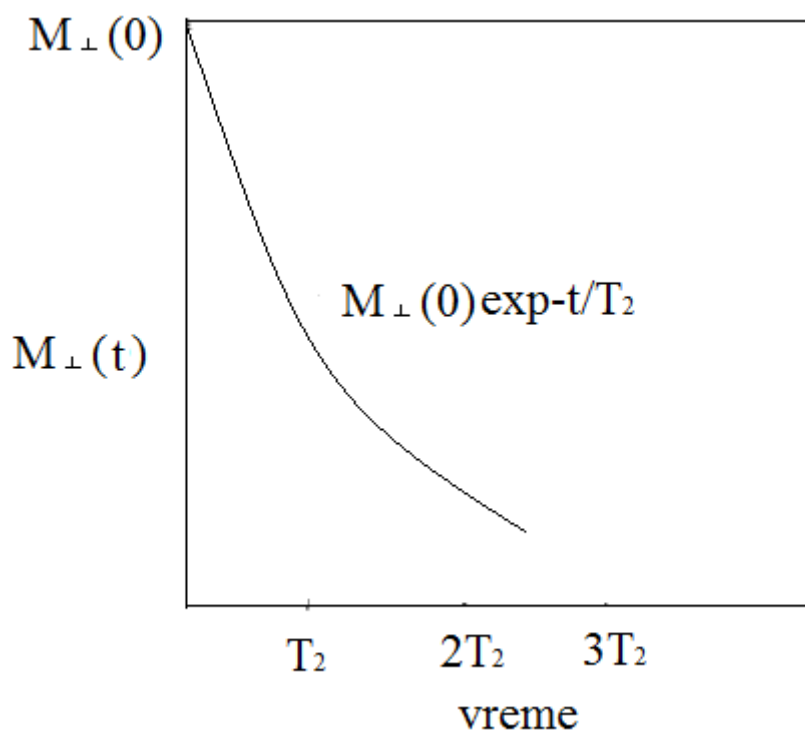
Временска константа T_1 је карактеристична за дато ткиво и дефинише се као време које је потребно да се поврати 63% од почетне лонгитудиналне магнетизације (*слика 6*). Опоравак лонгитудиналне магнетизације је изражен преко *Bloch-ове* једначине за M_z компоненту укупне магнетизације (*види једначину 12*). Параметар који у секвенци одређује степен опоравка лонгитудиналне магнетизације пре примене следећег РФ пулса је TR .



Слика 6 Опоравак лонгитудиналне магнетизације. Као што се може приметити временска еволуција магнетизације описује се експоненцијалном функцијом и зависи од релаксационих времена T_1 испитиваног ткива (прилагођено из [37]).

3.2.2.2 T_2 контраст

T_2 представља време које је потребно да трансверзална магнетизација опадне за 63% од почетне вредности. T_2 релаксација је изазвана разменом енергије међу језгрима (слика 7). Код спин-спин трансфера долази до губитка фазне кохеренције и експоненцијалног опадања нормалног магнетизационог вектора у трансверзалној равни (једначина 12).



Слика 7 Опоравак трансверзалне магнетизације (прилагођено из [37]).

Пробем који се јавља приликом одређивања T_2 времена релаксације је у томе што постоје локалне нехомогености магнетног поља које на трансверзалну магнетизацију утичу значајније него спин-спин релаксација. Комбиновани ефекат спин-спин релаксације и локалних нехомогености магнетног поља карактерише се константом T_2^* .

3.2.2.3 Протонска густина (*Proton density-PD*)

Контраст ткива приликом снимања PD базира се на густини протона. Ткива која имају малу густину протона показује низак сигнал због мале компоненте трансверзалне магнетизације. Овако наглашени снимци се добијају тако што се одабере дуго TR чиме се неутралише утицај T_1 и кратко TE за умањивање T_2 ефекта.

3.3 Дифузијски наглашено снимање

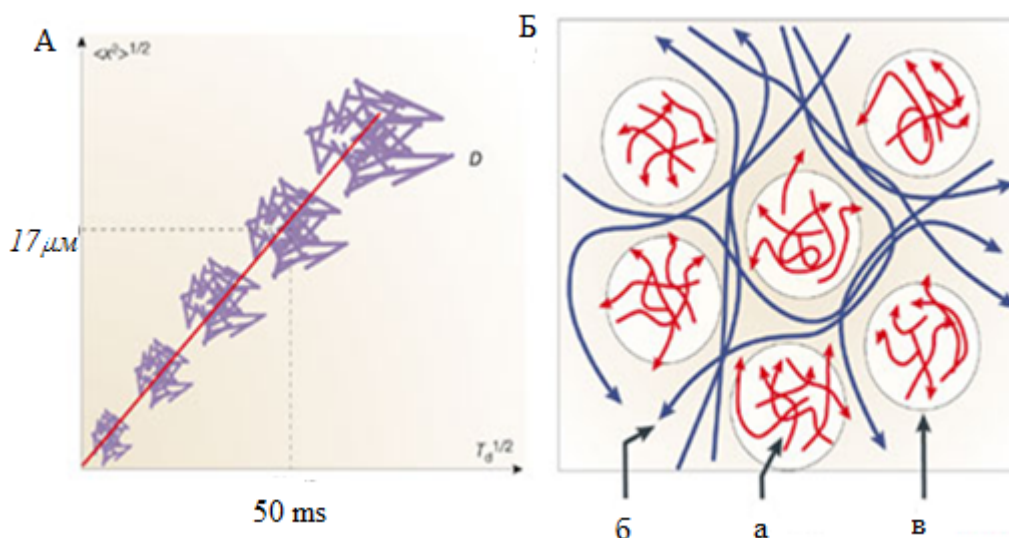
Дифузијски наглашено снимање магнетном резонанцијом (*Diffusion weighted imaging-DWI*) пружа јединствене информације о можданом ткиву због тога што контраст на слици између различитих структура у овој техници зависи од локалних особина дифузије воде. То је физички појам који дефинише молекуларни флукс пропорционалан концентрационом градијенту описан Фиковим законом [38], без специфичних механизма транспорта. Кретање молекула воде на микроскопском нивоу представља Брауново кретање и на макроскопском нивоу резултује у нето померају молекула.

Мерење дифузије би било могуће праћењем дифузије појединачних молекула, при чему би се на тај начин елиминисала потреба за дефинисањем компоненте дифузивности настале услед концентрационог градијента. Након неког времена сваки положај молекула би био одређен укупним померајем који је, пак, немогуће предвидети за одређени спин. Међутим, могуће је предвидети расподелу крајњих позиција групе молекула на основу теорије насумичног кретања (*random walk theory*). Под насумичним кретањем подразумева се да спин остаје на неопређеној локацији неко време t , а затим се помера у насумичном смеру за исту дужину. Ова веза помераја и времена дифузије је позната као Ајнштајнова једначина [39], која показује да што је веће време дифузије, односно што је већа дифузија и средњи квадрат помераја је већи (*једначина 15*)

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt_d \quad (15)$$

где је $\langle x^2 \rangle$ - средњи квадрат помераја, D - је дифузиони коефицијент, t_d - време посматрања.

За време типичног дифузионог периода, који траје око 50-100 ms, молекули воде се померају у мозгу просечно у раздаљинама око 10-20 μ m (*слика 8*) [40].

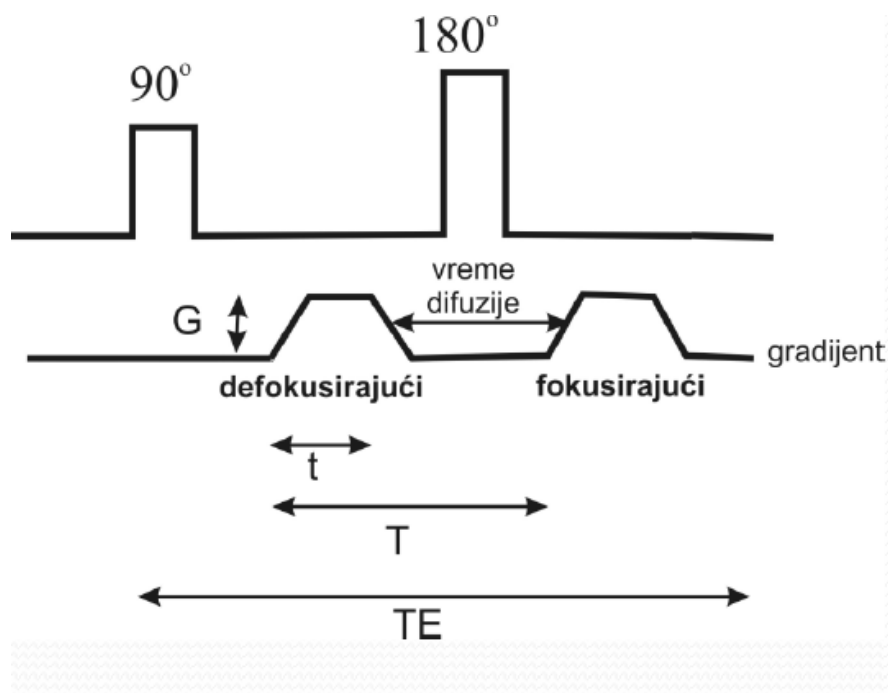


Слика 8. Насумично померање молекула описано Ајнштајновом једначином у једнодимензионалном простору. (А) Просечни квадратни померај ($\langle x^2 \rangle$) у случају великог броја молекула. 68% молекула се помери унутар сфере дијаметра $17 \mu\text{m}$ за време од 50 ms у можданом паренхиму. (Б) Дифузија воде може бити ограничена услед кретања унутар ћелије (а), тортуозне путање кретања (б) и размене воде између различитих делова (в) [40].

Дифузија, као савремена МРИ метода, приказује процесе на нивоу основних биолошких структура. Степен дифузије је под утицајем микроскопских структура као што су број и тип ћелија, просторни распоред ћелија, густине ћелијских мембрана, величине и типа присутних макромолекула и микроваскуларизације ткива. Од физичко-хемијских особина ткива на овај процес утичу вискозност и температура медијума. Нормално мождано ткиво је у зависности од структуре окарактерисано одређеним дифузијским статусом који може бити измењен као последица патолошких промена у ткиву [41].

3.3.1 Мерење дифузије у ткиву

Основне принципе мерења дифузије магнетном резонанцијом изнели су Стејскал и Танер (*Stejskal and Tanner*) [41]. Протони молекула воде изложени су, због локалних нехомогености основног магнетног поља, малим флукуацијама магнетног поља. С обзиром да је фреквенција прецесије протона директно пропорционална јачини поља, за разлику од статичних протона, протони који се крећу у магнетном пољу, развијају помак у фази прецесије, односно долази до губитка фазне кохеренције. Губитак фазне кохеренције протона условљен нехомогеношћу магнетног поља у ткивима доводи до губитка сигнала (*слика 9*).



Слика 9 Дифузијски наглашена спин ехо секвенца. Дифузијски градијентни пулсеви (ДГП) појачавају нехомогености магнетног поља и тиме повећавају осетљивост секвенце на дифузију. Пулсеви се примењују временски симетрично пре и након 180° РФ пулса и узрокују градијент магнетног поља. G -амплитуда, t -време трајања градијентног пулса, T -време између два пулса, TE -време еха.

Осетљивост секвенце на дифузију се описује фактором b , који зависи од γ , G , δ , Δ ; на начин описан Стејскал-Танер-овом једначином (једначина 16). Фактор b је мера осетљивости секвенце на дифузију, па са његовим повећањем расте контраст између ткива различитих дифузијских карактеристика

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \quad (16)$$

где је γ - жиромагнетни однос, G -амплитуда ДГП-а, δ -трајање ДГП-а, Δ - размак између два ДГП-а.

Интензитет добијених сигнала зависи од параметара који су представљени једначином 17

$$S = S_0 \exp(-bADC) \quad (17)$$

где је S -интензитет сигнала на дифузијски наглашеном снимку, S_0 - интензитет сигнала при $b=0$ и ADC (*apparent diffusion coefficient - ADC*)-привидни дифузиони коефицијент.

На дифузијски наглашеним снимцима на интензитет сигнала осим дифузије утиче и резидуални T_2 наглашени контраст ткива, тзв. T_2 “просејавање” (*T2 shine trough*) –т.ј. хиперинтензитет на DWI снимцима може бити последица ограничене дифузије молекула воде у ткиву, али и резидуалног T_2 контраста у ткиву. Та појава је присутна због релативно продуженог времена еха, што је последица коначног времена успостављања и трајања дифузијских градијентних пулсева. Због тога су DWI снимци у исто време и T_2 и дифузијски наглашени.

У свакодневној примени дифузијски наглашеног снимања су спин ехо ехопланарне-СЕ ЕПИ (*spin echo echo planar imaging SE-EPI*) секвенце, најчешће техника једног прелаза (*single shot*) где се цели К-простор попуњава након једне ексцитације [43]. ЕПИ секвенца је кратког трајања, па је релативно неосетљива на померање пацијента и физиолошко пулсирање у ткиву, које су представљале

основну ману ранијих МРИ техника за мерење дифузије. За настанак ЕПИ снимака потребне су знатно брже промене амплитуде градијената магнетног поља, односно могућност брзог пребацавања из високих позитивних у високе негативне амплитуде градијената магнетног поља. Недостаци ЕПИ снимака су релативно ниска просторна резолуција и склоност артефактима који настају због несавршености МР процедуре т.ј. услед ефекта хемијског помераја, утицаја разлика у магнетној сусцептибилности на граници ткива (нпр. граница ткиво - синуси), геометријских дисторзија индукованих вртложним струјама и нехомогеношћу магнетног поља. Ови ефекти су израженији при јачим магнетним пољима и већим амплитудама дифузионих градијената.

3.3.2 Привидни дифузни коефицијент

МРИ не разликује кретање молекула које је узроковано концентрационим градијентом од кретања због градијента притиска, топлоте, међуделовања јона или од кретања због протока крви, перфузије и пулсирања ткива, тако да се не може израчунати апсолутни, већ само привидни дифузни коефицијент [44-46]. Привидни дифузни коефицијент се израчунава на основу *једначине 18*

$$ADC = \ln\left(\frac{S_0}{S_1}\right)/(b_1 - b_0) \quad (18)$$

где је S_0 -интензитет сигнала на DW слици при $b_0=0$ s/mm², S_1 - интензитет сигнала при другој вредности b_1 . У савременим МРИ уређајима ADC мапа се аутоматски генерише.

Бројчана вредност привидног дифузног коефицијента може се измерити постављањем мерног подручја (*region of interest -ROI*) у структуре на ADC мапи [46,47]. На ADC мапи подручје јаче дифузије имаће виши сигнал, што је супротно сигналу на DWI снимцима.

3.3.3 DWI у дијагностици и диференцијацији тумора

Мапирање морфолошких карактеристика тумора (едем, цистични део, некротични део, вијабилно ткиво). одређује се мерењем разлике привидног дифузионог коефицијента која је узрокована променом покретљивости молекула воде у интрацелуларном и екстрацелуларном простору [48,49]. Велики број студија је показао да је одвајање тумора од околине помоћу визуелне, квалитативне процене морфологије на DWI снимцима и ADC мапама мање прецизно или упоредиво са морфолошким техникама магнетне резонанције [8,9,48-53]. Предност DWI и ADC мапа у преоперативној дијагнози тумора мозга је у процењивању целуларности или градуса тумора, разликовању контрастно појачаног од подручја тумора без њега, разликовање тумора од перифокалног едема, вијабилног тумора од некрозе и предвиђање туморског одговора на терапију [50]. Постоји корелација између вредности ADC-а са једне стране и туморске целуларности са друге стране. Прецизније речено тумори већег биолошког потенцијала према WHO класификацији, имају нижи ADC, нарочито неуроглијални тумори [51, 53]. Тај налаз ниског ADC-а објашњава се високом целуларношћу тумора што може помоћи у разликовању глиома високог градуса од глиома ниског степена малигнитета. Најнижа вредност ADC-а астроцитома (*WHO градус 2*) је сигнификантно виша од ADC вредности анапластичног астроцитома и глиобластома. Забележена је и нижа вредност ADC-а глиобластома у поређењу са анапластичним астроцитомом [50,52]. Међутим, *Lam et al.* [54] су, на основу својих истраживања, утврдили да не постоји сигнификантна разлика између градуса тумора на основу ADC вредности. Током праћења пацијената са можданим туморима, снижење ADC-а може упућивати на малигну трансформацију примарно доброћудног тумора, односно на промену хистолошког градуса, исто тако пораст ADC-а може одговарати позитивном одговору на лечење, најчешће у смислу појаве некрозе [55]. Некротични делови тумора имају углавном висок ADC са ниским интензитетом сигнала на DW снимцима, због релативно ниске вискозности и целуларности [56].

Често је разграничавање делова инфилтративних тумора који се постконтрастно не опацификују од перитуморског вазогеног едема тешко помоћу

конвенционалних МР снимака. Због опсега хирушке интервенције, планирања места биопсије и ирадијације одређивање граница тумора је веома важно, јер се ћелије инфилтративних тумора налазе и у подручју вазогеног едема, значајно удаљене од примарне масе тумора [57-59].

Цитотоксични или ћелијски едем је хиперинтензан на DWI и удружен са сниженом вредношћу ADC-а. Вазогени едем има променљив интензитет сигнала на DWI са сниженом вредношћу ADC-а. Он је реверзибилан, али повремено је удружен и са цитотоксичним едемом који обично није реверзибилан [60-62]. Студије су показале да је помоћу DWI снимака и ADC мапа, односно на темељу разлика у дифузивности молекула воде, могуће разликовање подручја туморске инфилтрације које се постконтрастно не појачавају у интензитету сигнала од перитуморског вазогеног едема [56,47,63-67]. Међутим, подручја тумора без постконтрастног појачања и подручја претежно вазогеног едема нису имала значајно различите вредности ADC-а [56,68]. Истраживања су показала да су разлике ADC-а постојале између тумора, едема и нормалног ткива, али су индивидуални подаци показали значајна преклапања ових вредности мерених на ADC мапама. У корелацији ADC-а и патохистолошког налаза подручја границе тумора и нормалног ткива такође је установљено преклапање ADC вредности тумора и перитуморског едема [67]. Потенцијално добре резултате у разликовање неуралних структура, али и класификацији астроцитома дало је и мерење бездимензионе величине, куртозис фактора (*excessive diffusion kurtosis-EK*, *Diffusion kurtosis imaging DKI*), који се може сматрати мером микроструктурне комплексности ткива у коме дифундују молекули воде [69-71].

Како би се избегла грешка при мерењу неопходно је анализирати ADC читаве запремине тумора што би омогућило квантитативне информације карактеристика и микрохетерогености тумора. Како успешност дифузијског МРИ-ја у многоставној зависи од људског фактора у овој тези смо проучавали могућност унапређивања већ постојећих метода у смислу примена независних техника класификације туморског ткива за разликовање солидног дела тумора од перитуморског едема, зона некрозе и хеморагије које би допринеле повећању успешности класификације тумора мозга.

Мануелна сегментација није погодна пре свега због времена трајања као и субјективности која је присутна приликом рада. С друге стране, применом полуаутоматских и аутоматских метода сегментације може се постићи задовољавајући ниво прецизности [13-15]. Такође, избегава се утицај субјективности приликом одабира региона од интереса (*region of interest - ROI*) [14]. Даљи напредак у разликовању глијалних тумора мозга је постигнут анализом хистограма читаве запремине тумора на ADC мапама што је омогућило разликовање подтипова нискоградусних тумора [72].

3.4 Магнетно резонантна спектроскопија

3.4.1 Хемијски померај

Језгра различитих атома се разликују према вредности жиромагнетног односа што омогућава добијање различитих резонантних фреквенција оваквих језгара. Резонантна фреквенција ω , осим зависности од γ и B_0 , зависи и од хемијског окружења посматраног језгра. Ова појава је позната као хемијски померај (*chemical shift*) [73,74]. Феномен хемијског помераја настаје услед дејства електронског омотача на језгро. Када се нађу у спољашњем магнетном пољу, електрони ће ротирати око B_0 у супротном смеру у односу на прецесију протона. Прецесија електрона је кретање наелектрисања, тако да им се може придружити магнетни момент, по аналогији са нуклеарним магнетним моментом. Магнетни момент електрона се супротставља дејству магнетног поља B_0 , умањујући магнетно поље које делује на језгро. На језгро ће деловати тзв. ефективно магнетно поље, које се може представити једначином 19:

$$B = B_0(1 - \sigma) \quad (19)$$

σ је бездимензиона величина која представља константу заклањања, зависи од хемијског окружења језгра и изражава се у ppm (*part per milion*).

Резонантни услов се описује једначином 20:

$$\nu = \left(\frac{\gamma}{2\pi}\right) B_0(1 - \sigma) \quad (20)$$

Хемијски помераји се углавном не изражавају у Hz већ у деловима на милион (part per million - ppm). Према конвенцији, дефиниција хемијског помераја је (једначина 21):

$$\delta = \frac{\nu_s - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \cdot 10^6 \quad (21)$$

где су ν_s и ν_{ref} фреквенције резонанције језгра у испитиваној супстанцији и језгра у референтном једињењу.

Интензитет сигнала који генерише одређена група језгара је линеарно пропорционалан њиховом броју у узорку (и последично концентрацији). После Фуријеове трансформације ова величина конволвира са T_2^* временом релаксације, због чега висина пика не може бити коришћена за квантификацију. Укупна површина пика је права мера спинске густине и добија се нумеричком интеграцијом. У пракси, због спектралног преклапања и флукуације базне линије, интеграција није тако прецизна, што може знатно да усложни одређивање површина.

3.4.2 Спин-спин спрезање

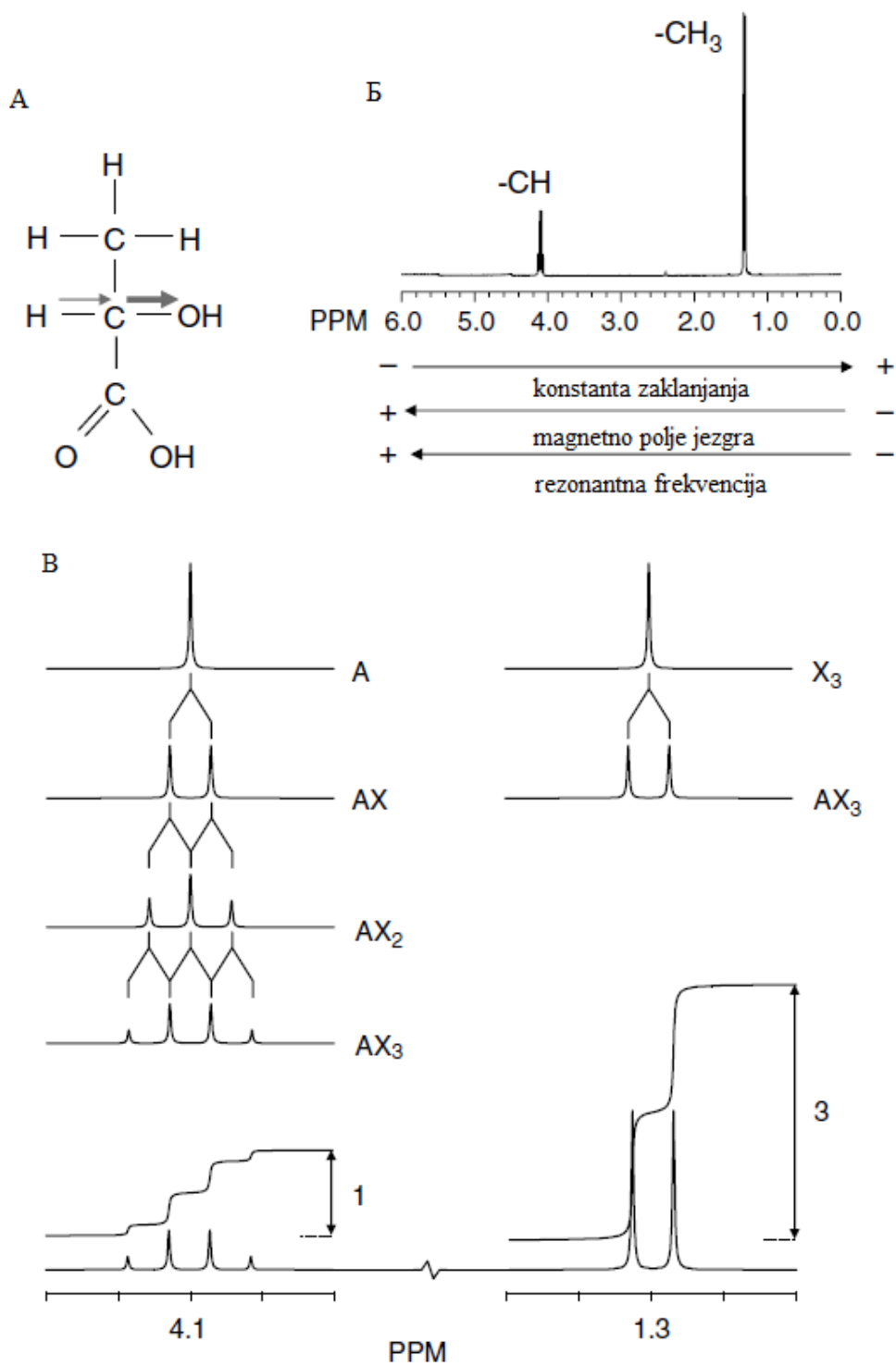
Поред резонантних фреквенција и амплитуда сигнала специфичност НМР спектра је и појава fine структуре спектра. Овај феномен потиче од чињенице да језгра са магнетним моментом делују једна на друга кроз простор (дипол-дипол интеракција) или преко хемијских веза (скаларна интеракција), назива се спин-спин спрезање [75]. У течностима и гасовима услед веома брзог кретања нуклеарних спинова резултанта диполарних интеракција једнак је нули.

Скаларна интеракција је карактеристична за течности и гасове. Магнетно дејство нуклеарних спинова се на суседна језгра преноси преко валентних

електрона који формирају везу и који, такође поседују своје магнетне моменте. Јачина спрезања нуклеарних спинова изражава се константном спрезања J , која зависи од електронске расподеле у хемијској вези и жиромагнетног односа језгра.

На *слици 10А* приказан је молекул лактата на основу које се може закључити да у њему електронегативан карактер атома кисеоника везаног у ОН групи смањује електронску густину око протона што условљава више Ларморове фреквенције, што се може видети и на НМР спектру лактата (*слика 10Б*). Овакав спектар потиче од протона метин групе који су ближи електронегативном атому кисеоника и три метил протона, последично дајући више фреквенције. Лактат се може посматрати као $A\text{X}_3$ спински систем (три магнетно еквивалентна метил протона спрегнута са протоном метин групе) (*слика 10В*). Протони из групе X_3 осећају протон А са две могуће оријентације магнетних момената услед чега се њихов резонантни максимум јавља у облику дублета, на 1.33 ppm. С друге стране магнетни моменти протона групе X_3 могу бити оријентисани на више начина која дефинишу четири спинска стања протона ове групе што даје квартет на 4.11 ppm. Како мултипле резонанције на 4.11 и 1.33 ppm потичу од једног и три протона, редом, релативне површине ова два мултиплета се односе 1 према 3 [75]. Константа купловања за лактат износи 7Hz.

Константа купловања J не зависи од примењеног спољашњег магнетног поља јер је базирана на фундаменталном принципу спаривања спинова и изражава се у Hz. Типичне вредности за констату купловања су: $^1\text{H}-^1\text{H}$ (1-15Hz), $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (100-200 Hz), $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ (70-110 Hz), $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ (10-20 Hz), $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ (30-80 Hz). Све J вредности су за једну хемијску везу, осим $^1\text{H}-^1\text{H}$ интеракције која се може простирати на две или три везе.



Слика 10. Спин-спин интеракција у молекулу лактата. (А) утицај електронегативности атома кисеоника на НМР спектар (Б). Цепанье резонантних линија спинског система AX_3 (В) (прилагођено из [75]).

3.5 *In vivo* протонска МР спектроскопија

Иако МР снимање даје изузетно прецизан приказ анатомских детаља, овим снимцима недостаје ткивна специфичност ако се узме да код већине патолошких процеса промене у метаболизму претходе анатомским променама. Магнетно-резонантна спектроскопија, посебно протонска је атрактивна због своје неинвазивности и релативно једноставног прикупљања података који омогућавају семиквантитативно одређивање концентрације метаболита и метаболичких односа. За *in vivo* примену је најзначајније језгро ^1H пре свега због своје распрострањености у људском организму. Осетљивост МРС ограничава детекцију метаболита на оне чије су концентрације веће од 1 mmol [76].

3.5.1 Технике локализације

Добијање спектра се постиже применом различитих техника; спектроскопија из једног воксела (*single voxel spectroscopy-SVS*) и спектроскопије из више воксела (*multi voxel spectroscopy*) локализације детекције метаболита, са дугим, средњим или кратким временом еха у комбинацији са супресијом сигнала воде. Веома је важно изабрати ону технику која је за дату специфичну намену одговарајућа. Свака техника може бити урађена као *Stimulated Echo Acquisition Mode - STEAM* и *Point-Resolved spectroscopy - PRESS* [75,77].

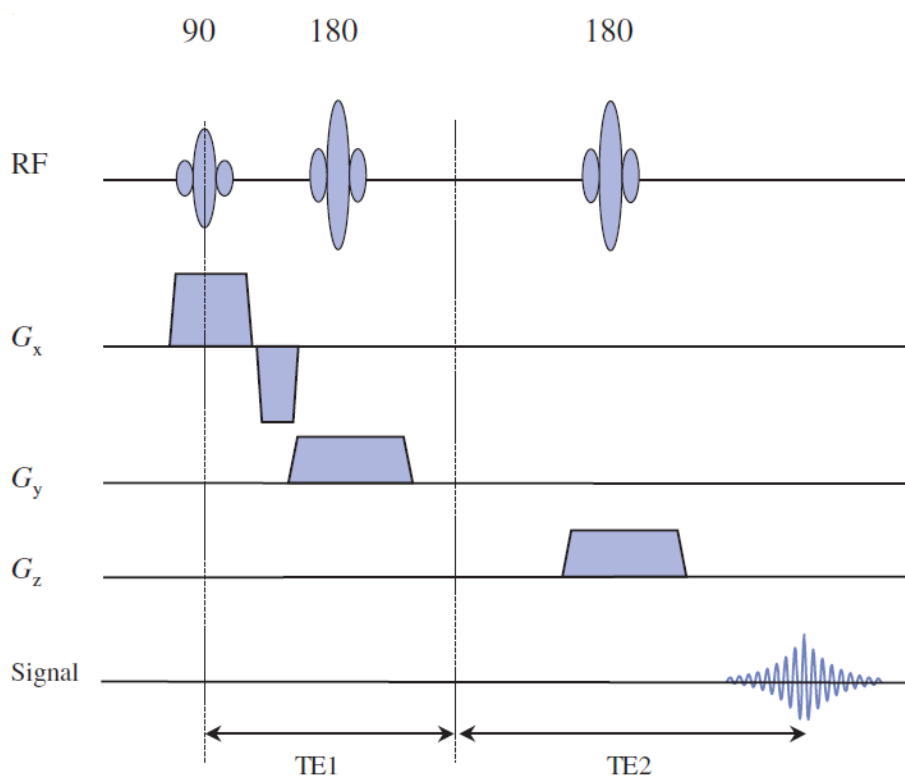
3.5.1.1 Спектроскопија из једног воксела

SVS подразумева детекцију сигнала из унапред селектованог елемента запремине [78]. Одабир жељеног воксела постиже се комбинацијом тродимензионалних ексцитација што се постиже симултаном применом РФ пулса и градијента поља. При процесу аквизиције сигнала примењује се и *PRESS* и *STEAM* техника. Обе садрже секвенцију из три пулса при чему је сваки пулс

комбинован са градијентима које врше локализацију и примењују се дуж x , y и z правца.

Спектроскопија из једног воксела *PRESS* техником

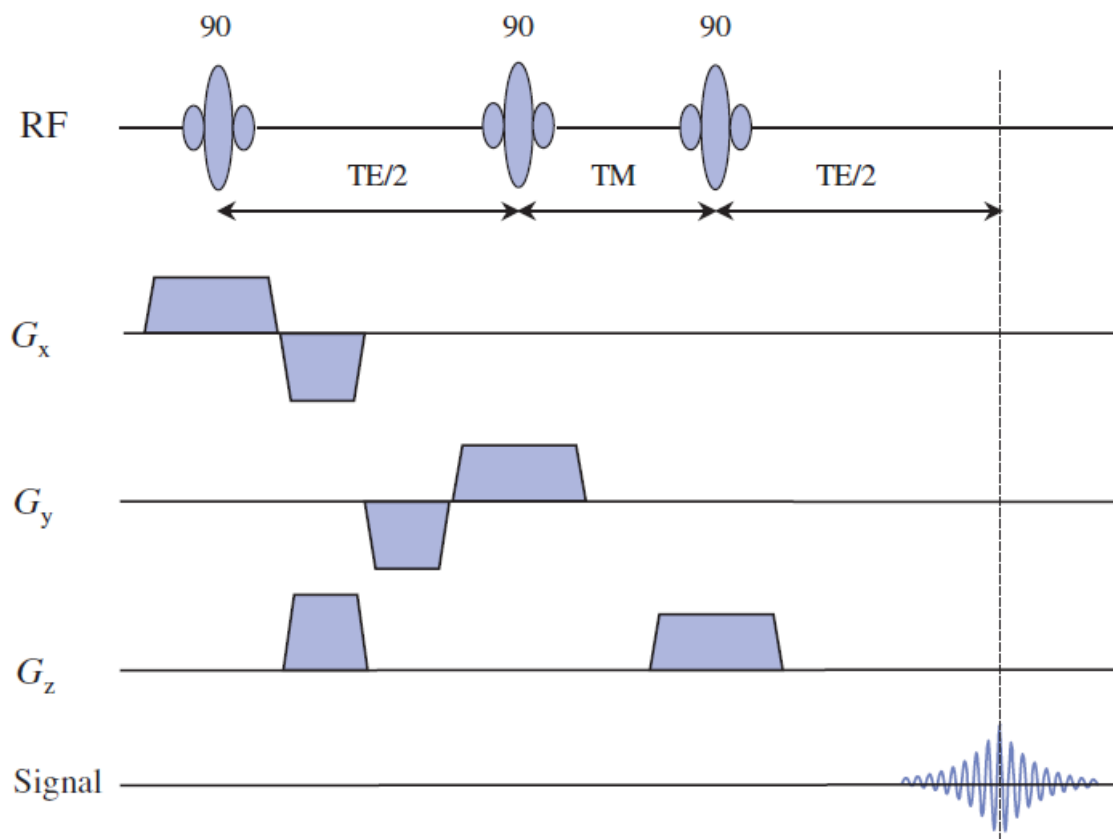
Најчешће примењивана *SVS* аквизициона техника је *PRESS* чија секвенција подразумева добијање спектра применом 90° пулса, праћеног са два 180° пулса [78]. Сва три пулса примењују се симултано са различитим градијентима магнетног поља те сигнал емитован из посматране запремине представља стимулирани спин ехо сигнал. Први 180° пулс примењује се у временском интервалу $TE/2$ након примене почетног 90° пулса, док се други по реду 180° пулс уводи након истека периода од $TE/2+TE$. Сигнал се јавља након временског периода који одговара $2TE$ (слика 11).



Слика 11. *PRESS* пулсна секвенција (прилагођено из [78]).

Спектроскопија из једног воксела *STEAM* техником

STEAM техника подразумева примену три селективна пулса од 90° уз градијенте магнетног поља [78]. Након временског периода $TE/2$ од примене првог пулса следи други, док временски период који раздваја други и трећи пулс 90° представља *MT* време (*mixing time- MT*) и знатно је краће од времена еха. Сигнал се јавља након збира TE и MT (слика 12). Овакав сет пулсева производи четири ехо сигнала од којих је један стимулирани ехо сигнал тј. сигнал од интереса у МРС. Због чега је и време трајања ове технике знатно краће од *PRESS*.



Слика 12. *STEAM* пулсна секвенција (прилагођено из [78]).

Како *STEAM* секвенца користи искључиво селективне 90° пулсеve поседује двоструко нижи сигнал-шум у односу на *PRESS*, који користи два 180° пулса што

доводи до лошијег дефинисања волумена од интереса, али бољим односом сигнал-шум.

3.5.1.2 Спектроскопија из више воксела

Спектроскопија из више воксела (*chemical shift imaging-CSI*) комбинује специфичност МР спектроскопије са техникама просторне локализације које се користе у МРИ [78]. Разлика у односу на МРИ је што се овде не примењује градијент фреквенционог кодирања. И ова техника може да се ради као *STEAM* или *PRESS*. За разлику од SVS, код ове технике се одабира дводимензионални матрикс од више воксела (најчешће 8x8, 16x16) из којих ће се добити спектри. Анализа добијених спектра се може извршити за сваки од појединачних воксела из дефинисаног матрикса.

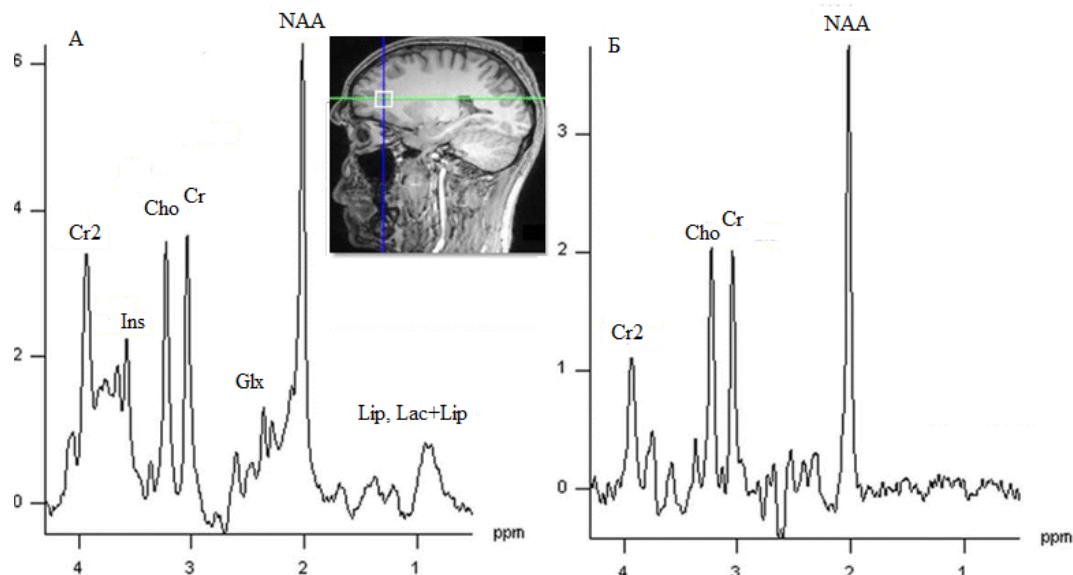
3.5.2 Утицај избора времена еха на изглед спектра

Магнетно резонантна спектроскопија се може извести применом различитих времена еха, што резултује спектрима различитих карактеристика. Као и код МРИ-ја ТЕ се односи на време које магнетизациони вектор проведе у транзверзалној равни након ексцитације пре читања сигнала. Током овог времена сваки метаболит се релаксира својим карактеристичним T_2 релаксационим временом. При томе амплитуда сигнала за протоне који су J-спрегнути је модулисана, као код лактата чије су резонанције на $TE=144$ ms инвертоване испод основне линије, што омогућава њихово раздвајање од резонанција липида са којима се преклапају на кратким ТЕ. Одабиром дугог времена еха, типично > 135 ms знатно се поједностављује добијени спектар, због мањег броја метаболита који се могу детектовати. Историјски гледано, у клиничке сврхе веома се често бира дуго ТЕ због доброг раздвајања три главна метаболита у МР

спектроскопији, Н ацетил аспартат, холин, креатин. Такође, овако добијени спектри су мање осетљиви на несавршености хардверског система. Кратко време еха подразумева време од ≈ 35 ms. Спектар добијен са таквим одабиром ТЕ има бољи однос сигнал шум у поређењу са дугим ТЕ. Карактерише га већи број детектованих метаболита, што усложњава његову интерпретацију.

3.5.3 Метаболити у протонском МР спектру

Најзначајнији метаболити који се детектују у ^1H МР спектрима мозга (слика 13) и/или можданих патологија су: Н-ацетил аспартат (*N-acetylaspartate-NAA*), холин (*choline-Cho*), лактат (*lactate-Lac*), липид (*lipid-Lip*), креатин/фосфокреатин (*creatine/phosphocreatine-Cr*), глутамат (*glutamate-Glu*) и глутамин (*glutamine-Gln*), миоинозитол (*myoInozitol-mI*), глицин (*glycine-Gly*) [79-82].



Слика 13. MR спектри мозга здраве особе са различитим временима еха. (А) $TE=30\text{ ms}$ и (Б) $TE=135\text{ ms}$. Као што је приказано на спектрима резонанције липида и лактата нису уочљиве код здравих особа [68].

3.5.3.1 N-ацетил Аспаргат (NAA)

Доминантна резонанција у МР спектру нормалног možданог ткива потиче од метил групе NAA и налази се на 2.02 ppm [81]. Ова резонантна линија је синглет и због дугачког T_2 времена релаксације и за разлику од осталих резонанција NAA, веома мало зависи од избора TE. NAA је лоциран искључиво у централном и периферном нервном систему. Концентрација овог метаболита варира у различитим деловима мозга и мења се током животних доба. И поред бројне литературе о синтези, дистрибуцији и евентуалној функцији, тачна улога је углавном непозната. У *in vivo* МРС, NAA се користи као маркер неурона односно функције неурона. Концентрације се смањују у поремећајима код којих долази до губитка неурона, као што су различити патолошки процеси - исхемија, možдани инфаркт, тумор, мултипла склероза итд. Једина болест код које долази до повећања његове концентрације је Канаванов синдром (*Canavan's syndrome*).

У *in vivo* МРС мозга синглет NAA на 2.02 ppm се делимично преклапа са резонанцијом глутамата на 2.04 ppm и GABA на 1.91 ppm, што усложњава његову квантификацију.

3.5.3.2 Креатин

У протонском спектру нормалног ткива које садржи креатин киназу, синглет резонанције креатина се налазе на 3.03 ppm и 3.93 ppm [81]. Ови синглети потичу од метил и метиленских протона креатина и фосфокреатина. Интензитети резонанција креатина су релативно независни од примењеног ТЕ. Разлика у хемијском померају између креатина и фосфокреатина је много мања од типичне ширина линије *in vivo* па оне формирају једну линију која одговара укупном креатину (*total creatine tCr*).

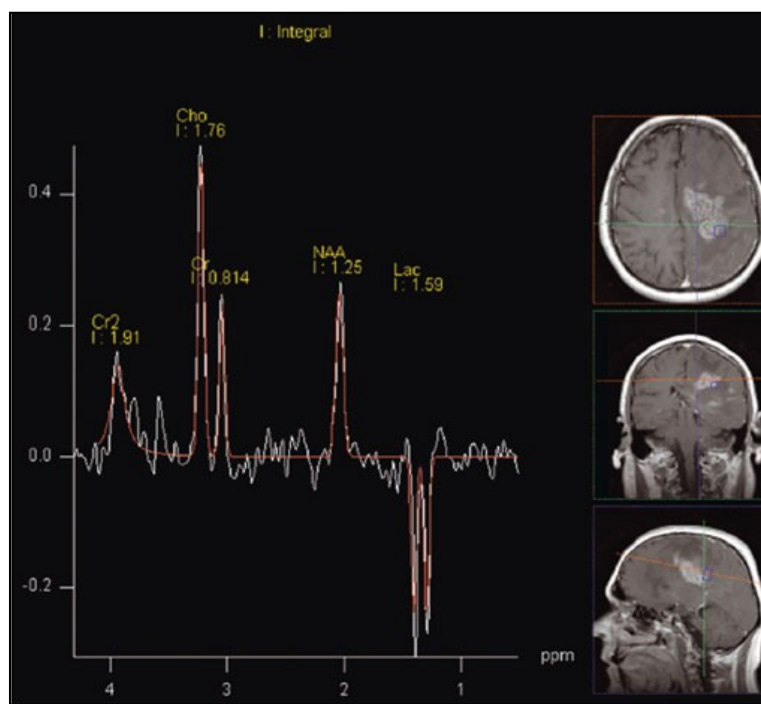
(Фосфо)креатин игра кључну улогу у енергетском метаболизму ткива. Сматра се да служи као енергетски депо чија је улога одржавање нивоа АТП-а константним кроз реакцију креатин киназе и као транспортер енергије дифундујући од места на којима се производи енергија (митохондрије) до места на којима се енергија искоришћава.

Поред тога постоје неке контроверзе око његове тачне улоге (у комбинацији са креатин киназом). Сума креатина и фосфокреатина код одраслих особа и код већине патологија (сем у хроничним фазама неких од њих) је константна, што чини резонанцију укупног креатина погодном за интерни стандард [80]. Креатин је присутан у свим можданим ћелијама.

3.5.3.3 Холин

Холин је присутан у мањој концентрацији у поређењу са поменутиим метаболитима [81]. И поред тога он даје резонантну линију на 3.22 ppm, која потиче од девет магнетно идентичних протона распоређених у метил групама холинског остатка $-N(CH_3)_3$. Осим синглета на 3.22 ppm, холин има резонанције

на 3.54 ppm и 4.05 ppm. Ове линије су знатно мањег интензитета, преклапају се са многим другим и не могу се уочити *in vivo*, али дају допринос другим, интензивнијим линијама што отежава њихову квантификацију. Пошто бројни метаболити који садрже холин доприносе линији на 3.22 ppm, уобичајено је да се користи термин компоненте које садрже холин. У мозгу и мишићима, највећи допринос пику холина дају фосфорилхолин и глицерофосфорилхолин. Фосфатидилхолин, који је најважнији метаболит холина у мозгу, при нормалним околностима није уочљив помоћу МРС. Компоненте које садрже холин су укључене у путеве фосфолипидне синтезе и деградације тако да рефлектују баланс у синтези и деградацији мембрана (eng. *membrane turnover*). [82,83]. Типично, патолошки процеси који доводе до пораста концентрације овог метаболита укључују активну демиелинацију (резултата деградације мијелинских фосфолипида до глицерофосфорилхолина) или повећање броја глијалних ћелија (слика 14).



Слика 14. Повишене концентрације холина код високоградусног тумора мерене спектроскопијом једног воксела са TE 135 ms.

3.5.3.4 Глутамат/глутамин

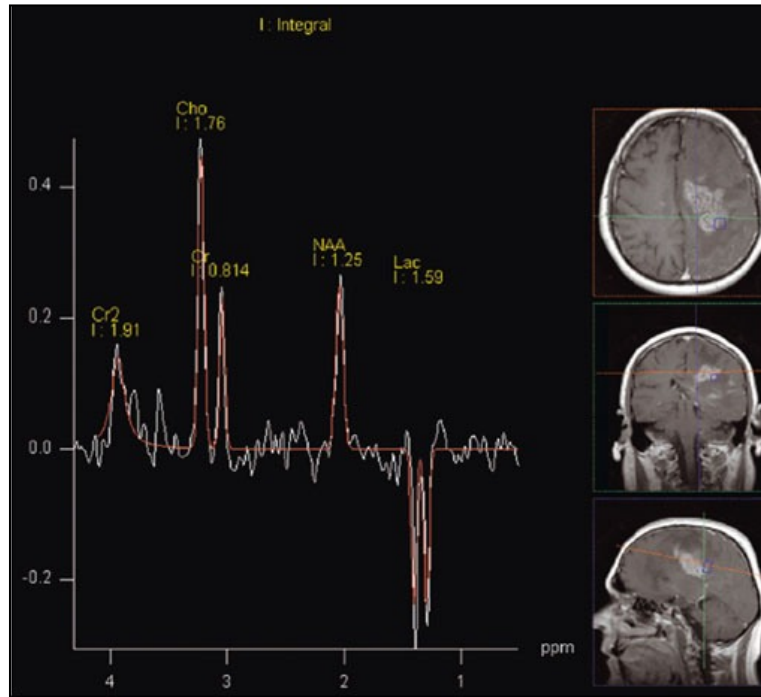
Протонски спектар глутамата и глутамина се састоји од спрегнутих резонанција што његову интерпретацију у спектру чини веома сложеном. То се може илустровати чињеницом да је глутамат у мозгу присутан у концентрацији блиској концентрацији NAA или чак и већој (~8 mM), али се много ређе описује и квантификује. Концентрација глутамина је значајно нижа (~2 mM) [76,80]. Поред зависности од TE, спектар глутамата и глутамина јако зависи и од јачине магнетног поља, при јачим пољима се значајно смањују ефекти спрезања. Глутамат је један од главних екситаторних неуротрансмitera у централном нервном систему. Концентрација глутамата је највећа у неуронима, али се налази у свим типовима можданих ћелија. Повећан садржај глутамата јавља се код високоградусних тумора, можданог инфаркта и неких неуродегенеративних болести.

3.5.3.5 Миоинозитол

Линије инозитола детектоване су у МР спектрима можданог ткива и бубрезима *in vivo*. Резонантне линије миоинозитола се налазе на четири различите позиције; 3.28, 3.54, 3.60 и 4.05 ppm. Најизраженија резонанција mI (при кратком TE) је на 3.56 ppm. Миоинозитол је лоциран у астроцитима где игра улогу осмолита или регулатора ћелијског волумена. Коришћењем секвенција са кратким временом еха, у људском мозгу је детектован и сцилоинозитол (*sI*) на 3.36 ppm. Пик сцилоинозитола је синглет који потиче од 6 магнетно идентичних СН протона [80,81]. Концентрација миоинозитола је знатно повишена код Алцхајмерове болести, као и код тумора мозга, док је код хепатичке енцефалопатије [84], настале као последица акутне или хроничне исуфицијенције јетре, концентрација овог метаболита у мозгу испод нормалних вредности.

3.5.3.6 Лактат

Могућност мерења церебралног лактата је била једна од покретачких снага у развоју локализоване *in vivo* протонске МРС. Лактат (со млечне киселина) је веома важан метаболички маркер. Његова концентрација значајно расте у аеробним условима. Три метил протона дају дублет на 1.33 ppm, док метински протон даје кватрлет на 4.11 ppm. Код већине протонских спектра *in vivo* овај кватрлет је делимично угашен супресијом воде. Сигнал дублета на 1.33 ppm се лако уочава када је повећана концентрација церебралног лактата иако је потребна добра просторна локализација да би се елиминисао утицај липида масног ткива јер су њихове резонантне линије између 0 и 2 ppm. Присуство пика лактата се лако потврђује варирањем времена еха. То је директна последица скаларног спрезања која даје фазну еволуцију метил дублета зависну од ТЕ. На средњим временима еха резонанција показује фазу од 180° што даје негативне резонанције, али у фази, а познато је да се само резонанције које су у фази могу детектовати, због чега је пик лактата на овим ТЕ инвертован. При временима еха блиским парним мултиплицитетима 1/Ј дублет лактата је позитиван, тј у фази са другим резонанцијама док је при непарним мултиплицитетима 1/Ј негативан. Пик лактата се не уочава на спектру нормалног мозга. Његово присуство указује на патологију. Јавља се у случају митохондријалног дефицита, присуства малигних ћелија (анаеробна гликолиза), инвазије макрофага и појаве шлога. Концентрација лактата је блиска граници НМР детекције (~1 mM), при нормалним аеробним условима. Код поремећаја као што су хипоксија, траума, мождани инфаркт или тумор лактат може да се повећа и до концентрација преко 10 mM (слика 15) [80,81].



Слика 15 МР спектар глиобластома при $TE\ 135\ ms$ на коме се може приметити инвертован дублет лактата.

3.5.3.7 Аминокиселине

Магнетно-резонантном спектроскопијом се осим наведених метаболита, у појединим патолошким стањима могу детектовати и поједине аминокиселине, нпр. аланин, аспартат, γ Аминобутрилна киселина (γ -aminobutric acid-GABA), глицин, таурин и др [81]. Дублет аланина се најчешће запажа у спектрима менингеома [75], док се појава пика таурина сматра специфичном за медулобластома [85]. Глицин даје допринос резонанцији на 3.56 ppm, тако да га је тешко разликовати од mI. Повишене концентрације овог метаболита у мозгу се јављају као последица глицинске енцефалопатије (*nonketotic hyperglycinemia*) [86], која настаје као последица генетских промена у организму.

3.5.3.8 Макромолекули

Прецизна просторна локализација је кључна код протонске МРС, између осталог и због елиминисања нежељених резонанција липида (нпр. поткожно масно ткиво).

С друге стране, метаболизам масти је важно подручје којем МР спектроскопија може значајно да допринесе. Преко 20% масе мозга чине липиди, у форми мијелина, фосфолипида, сфинго-мијелина и лецитина. Ови макромолекули се не уочавају све док неки патолошки процес не ослободи МРС видљиве триглицериде и дугачке ланце масних киселина из њиховог састава. Од посебног интереса је ослобађање масних киселина за време и након исхемије као и у одређеним типовима тумора. Ови подаци дају информацију о потенцијалном оштећењу мембрана. Масти, липиди и остале резонанције макромолекула се налазе у регији између 0 и 2 ppm [80,81].

3.5.4 Магнетно-резонантна спектроскопија у разликовање тумора мозга

Иако МР снимање пружа изузетно прецизан приказ анатомских детаља, овим снимцима недостаје ткивна специфичност. Магнетно-резонантна спектроскопија привлачи све већу пажњу због релативно једноставног прикупљања и интерпретације података, што се посебно односи на протонску МРС [87]. Код већине патолошких процеса, промене метаболизма претходе анатомским променама током прогресије болести и терапије [73]. Повишена концентрација Cho се повезује са повећаном целуларношћу [88], пролиферативном активношћу и синтезом ћелијске мембране па се сматра најпоузданијим показатељем малигности глиома у оквиру МРИ-ја [89,90]. Добро је позната и чињеница да се код малигне трансформације обично уочава повећана концентрација холина, као и снижене вредности концентрације NAA уз појаву

Lip/lac пикова у спектру [73]. Таква се подручја најчешће налазе код глиобластома мултиформе, док су нешто ређа код астроцитома 2 градуса. Иако се Cho узима као мерило малигности однос овог метаболита и креатина није увек јасан показатељ степена малигнитета. Запажено је да код високоградусних тумора није редак случај налаза ниске концентрације Cho и снижених вредности Cho/NAA које би одговарале нискоградусним глиомима [91], што може довести до лажно позитивних, односно негативних налаза [92], због чега постоји велика тежња за проналажењем нових биомаркера.

Скорашња истраживања се све више усмеравају на разумевање механизма којим глијалне ћелије утичу на ћелијску физиологију и локално микроокружење тумора чиме се олакшава раст тумора. Међутим, разумевање самог механизма овог процеса раста је имало ограничен успех због негативних резултата који су добијени у клиничким студијама у којима се испитивао фактор епидермалног раста (*epidermal growth factor – EGF*) [93].

Стога налажење нових биомаркера који би допринели бољем разумевању тих механизма је од изузетне важности. Као потенцијални биомаркер сматра се ексцитаторни неуротрансмитер, глутамат, који је природно веома распрострањен у мозгу [94]. Међутим, сматра се да код тумора, услед нарушеног нормалног транспорта глутамата долази до његовог ослобађања из астроцита што знатно превазилази капацитет здравих астроцита за преузимање истог, при чему долази до поремећаја хомеостазе глутамата. Тиме се ствара неуротоксична средина која је погодан услов за раст тумора [95].

Поред глутамата, улога mI у разликовању можданих тумора, иако још увек у потпуности необјашњена отвара нове могућности у разумевању и спречавању раста тумора [96].

Варирањем параметара МРС снимања могуће је регистровати пик глицина [97]. Ова аминокиселина се показала као метаболит од значаја у градирању глијалних тумора и маркер који директно упућује на метилациони статус тумора, нарочито глиобластома што значајно утиче на избор терапије. Наиме, данас се у лечењу ових тумора употребљава хемиотерапеутик Темозоломид. Његова улога

је да изврши метилацију на тачно одређеним местима чиме модификује ДНК али се та места брзо поправе дејством протеина па лек губи своје цитотоксично дејство [98].

У тези су проучавани биохемијски профили добијени за различите градусе тумора у смислу присуства/одсуства појединих метаболита и њихових концентрација, нарочито Gly, као једног од биомаркера лошег одговора на терапију и неповољне прогнозе болести код ГБМ-а. Што је посебно значајно с обзиром да и рекурентни ГБМ тумори и терапијске секвеле, псеудопрогресија, могу бити клинички идентични, асимптоматски или симптоматски. Рано дијагностиковање и разликовање ова два ентитета у многоме доприноси одлуци о адекватном терапијском приступу [99-101]. Док рекурентни прогресивни тумори захтевају ре-операцију или другачији третман специфичног онколошког лечења, терапијске секвеле захтевају најчешће само праћење или примену симптоматске терапије.

Такође, испитивана је примена фракталне анализе као морфометријске мере неправилности структуре тумора и одређивања метилационог статуса високоградусних тумора што би омогућило разликовање подтипова ових тумора.

Постоји значајан клинички потенцијал за примену и даље унапређивање техника обраде МРИ снимака које пружају додатне информације везане за биологију и физиологију тумора, чиме протонска МРС и дифузионо снимање добијају на значају као методе избора у дијагностици тумора ЦНС-а.

3.6 Мултиваријантне методе сегментације слике

Сегментација има за циљ кластеризацију, односно груписање, пиксела у смислене регионе на слици, тј. регионе који одговарају појединим површинама на слици [102-104]. При оваквој дефиницији намећу се услови да сума сегментованих региона укључује све пикселе на слици, да се различити региони сегментације не смеју међусобно преклапати, пиксели истих региона морају имати сличне особине, пиксели који припадају различитим сегментованим регионима имају различите особине и да су пиксели у истом сегментном региону повезани.

3.6.1 Сегментација кластеризацијом

За вектор $\vec{x} = [\vec{x}_1, \vec{x}_2 \dots \vec{x}_N]^T$ који представља мерења карактеристика једног пиксела слике мерене величине могу бити три компоненте боје слике или само сива скала израчуната у малом прозору око посматраног пиксела. Поступак сегментације се у том случају састоји од N-димензионог простора у узајамно искључивим областима, при чему свака та област обухвата групу података која се односи на један регион слике [102,103].

Настали региони би требало да покажу висок интерни хомогенитет унутар кластера, и високу екстерну различитост. Међутим, решења у кластер анализи нису јединствена, као што чланство у кластру за било који број решења зависи од многих елемената у процедури, и многа различита решења могу бити добијена варијатетима једног или различитих елемената. Коначно, кластер решења у потпуности зависе од променљивих које су коришћене као основа за меру сличности.

Један од најпопуларнијих алгоритама за кластерску анализу је метода Ц средина са нејасним границама кластера (*fuzzy C means clustering*)³ [103]. Код ове методе постоји само једно решење за унапред задати број кластера. Према овом

³ У домаћој литератури се у назив ове технике користи у енглеском оригиналу.

алгоритму пиксел се повезује са оним кластером према чијем центру има најмању удаљеност. При чему се основно мерило удаљености дефинише као квадрат еуклидског растојања (*једначина 22*).

$$D_{e_{12}}^2 = (x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 \quad (22)$$

Може се приметити да што су два пиксела (x, y) сличнија то је D_e^2 мање. Највећи недостатак Еуклидске удаљености је у немогућности статистичког тестирања израчунатог D_e .

Требало би нагласити да када је у питању припадност пиксела скупу (кластеру), у класичној теорији скупова постоји јасна граница припадности скупу, па један елемент или припада или не припада одређеном скупу. Међутим, „*fazi*“ скуп представља класу пиксела са разуђеним границама, где прелаз од припадања одређеном кластеру до неприпадања том истом кластеру није оштар већ постепен односно „*fazi*“ скуп је класа пиксела са бесконачно много степени припадања [105]. С обзиром на различите модалитете за добијање медицинских слика, избор одговарајућег алгоритма постаје важан задатак. Алгоритми на бази „*fazi*“ теорије су се показали као успешни у сегментацији медицинских слика, јер чувају информације о детаљима слике, брзи су и једноставни за примену, што је показано на сегменту МРИ слике региона церебралног паренхима новорођенчета [106], сегментацији МРИ динамских слика дојке [107], као и сегментацији туморског од не-туморског ткива [108].

3.7 Линеарна дискриминантна анализа –ЛДА

Линеарна дискриминантна анализа је статистичка метода класификације објеката у међусобно искључиве групе на основу променљивих које праве разлику између објеката [104,109]. Циљ анализе је да се дефинише мањи број „нових“ променљивих, које би описале разлику међу групама. Те нове променљиве се називају дискриминантним. За разлику од анализе главних

компонента (*principal component analysis - PCA*) која има улогу редукције мултидимензионалног простора, ЛДА одређује правце у којима је разлика између класа максимална. Према *Fisher*-у [110] број дискриминантних функција је једнак броју класа минус један, у случају када је број променљивих већи од броја класа. Кораци у линеарној дискриминантној анализи су: одређивање дискриминантних променљивих тј. променљивих на којима се групе што је могуће више разликују, редуковање броја дискриминантних променљивих тј. задржавање само оних којима се центроиди појединих група статистички разликују и интерпретација дискриминативних променљивих помоћу оригинала.

Оригиналне променљиве представљају предикторе, а селекторске променљиве оне које одређују припадност ентитета појединој групи се називају критеријумске. У сваком кораку анализе, анализирају се и оцењују све променљиве како би се одредило која највише доприноси дискриминацији група. Вредност F је величина на основу које се доноси закључак о избору променљивих у ЛДА. Ова вредност показује статистичку значајност променљиве у дискриминацији између група и као таква представља меру јединственог доприноса поједине варијабле у поступку предикције припадности неког објекта групи. Увек се бира она варијабла која има највећу вредност коефицијента F . *Wilxon-lambda* параметар је показатељ статистичке значајности дискриминантне снаге модела и има вредност од 1 (када нема дискриминантне моћи), до 0 (максимална дискриминантна моћ). Линеарна дискриминантна анализа је већ успешно примењена на класификацију високоградусних и нискоградусних тумора [85, 111, 112], као и у постављању диференцијалне дијагнозе глијалних тумора [113].

3.8 Фрактална анализа

Фрактали и фрактална геометрија представљају математички концепт који је произашао из немогућности класичне Еуклидове геометрије да послужи у анализи комплексних и неправилних облика [114]. Многе сложене анатомске

структуре у људском организму као што су мреже крвних судова, неуронске мреже, гранање кардио-пулмонарних структура само су неки од примера фракталне геометрије [18-20, 115].

Концепт фрактала најчешће се повезује са ирегуларним геометријским објектима који показују својство самосличности. Фрактални објекти су састављени од субјединица, које су опет састављене од својих субјединица и тако редом. Иако класична Еуклидова геометрија веома успешно може да опише правилне глатке објекте као што су кругови или квадрати, она није довољно адекватна за комплексне неправилне објекте. Два основна појма у фракталној геометрији на којима она почива су појмови самосличности и димензионалности. Ово је лако објаснити преко конструкције Кохове криве. Кохова крива се конструише итеративним процесом, при чему у свакој итерацији централна трећина сваког сегмента праве линије (иницијатора) се замењује са два идентична сегмента који стоје под углом од 60° (генератор). Ова крива тако поседује веома интересантна својства нпр. да је њена дужина бесконачна и то унутар ограничене површине.

Самосличност произилази директно из метода конструкције теоријских фракталних објеката. Наиме, уколико се било који део криве издвоји и зумира, може се видети да сваки увеличани део опет представља исту криву. С друге стране, појам димензионалности овде је много комплекснији него код Еуклидове анализе. У фракталној анализи димензије могу имати „преломљену“ односно нецелобројну вредност и таква димензија се онда назива фрактална димензија. Постоји много типова фракталне димензије и метода за њихово одређивање.

Поред великог броја метода, за фракталне структуре које нису добијене строго дефинисаним правилима примењује се метода пребројавања квадрата (*box-counting*) [116]. Метод се заснива на прекривању фракталног објекта мрежом квадрата (блокова). Димензије ивица квадрата су ε . Затим се одређује број квадрата који нису празни тј. који прекривају фрактални објекат $N(\varepsilon)$. Итеративним процесом се узимају квадрати различитих димензија и прекрива остатак. У граничном процесу узимањем квадрата све мањих ивица D_B као фрактална димензија или димензија добија се:

$$D_B = - \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\log N(\varepsilon)}{\log(\frac{1}{\varepsilon})} \quad (20)$$

Обзиром да се гранична вредност 0 не може употребити у случају природних објеката, ова димензија се рачуна графичким путем, и једнака је нагибу криве на *log-log* дијаграму на којем је зависност $\log N(\varepsilon) = f(\log 1/\varepsilon)$. У случају примене метода пребројавања квадрата за одређивање фракталне димензије неког биолошког ентитета, ивица најмањег блока у последњој итерацији не може бити једнака нули, већ зависи од резолуције слике. У таквим случајевима D_B се одређује као нагиб криве на сегменту који је линеаран на *log-log* графику.

Фрактална димензија је само један од алата у фракталној анализи, која даје индекс капацитета посматраног фракталног објекта да попуни простор у коме се налази. Међутим, она не даје информацију о обрасцу попуњавања. Због тога је *Mandelbort* [117] предложио једну другу димензију која се назива лакунарност (*lacuna-lat. praznina*). Лакунарност се може схватити као мера дубинске неравномерности текстуре посматраног објекта. Што је већа дубина, већа је лакунарност. Образац варијације нивоа сиве скале на сликама може бити описан преко мере фракталне текстуре, односно лакунарности. Ова мера је дата као (*једначина 23*):

$$A(\varepsilon) = \lambda \varepsilon^{2-D_L} \quad 23$$

где је $A(\varepsilon)$ површина површи мерена квадратима дужине ивице ε , λ -скалирајући фактор, а D_L је фрактална димензија или мера текстуре површине.

У примени на обраду слике, алгоритам узима сваку тачку (пиксел) снимка и додељује му „висину“ односно „дубину“ која одговара вредностима нијансе сиве скале. Разлика у овако дефинисаним „висинама“ или „дубинама“ суседних пиксела се мери преко целе посматране површине и фрактална текстура се рачуна према једначини 24

$$A(\varepsilon) = \sum_{x,y} \varepsilon^2 + \sum_{x,y} \varepsilon | I[x, y] - I[x + 1, y] | = | I[x, y] - I[x, y + 1] | \quad 24$$

где је $I(x,y)$ интензитет висине израчунат за одређену вредност ε , преко осредњавања вредности за околне пикселе да би се добили квадрати чије су ивице ε .

Фрактална димензија се одређује преко двоструког логаритамског дијаграма на којем се дају вредности $\log A(\varepsilon)$ у зависности од $\log(1/\varepsilon)$ и једнака је нагибу ове криве.

4. Експериментални део

4.1 Материјали и методе

4.1.1 Центри у којима је реализована докторска дисертација

Докторска дисертација је реализована у Центру за радиологију и магнетну резонанцију Клиничког Центра Србије и Одељењу радиолошке дијагностике, Институт за онкологију и радиологију Србије у Београду.

Студија је одобрена од стране етичког комитета Института за онкологију и радиологију Србије.

4.1.2 Испитаници

У рад су укључени пацијенти са налазом новооткривеног интракранијалног тумора на прегледу магнетне резонанције, који је накнадно доказан патохистолошким налазом.

Укупно је анализирано 65 пацијената од тога 31 мушкарац и 34 жене, просек година 25-65. Од тога 36 пацијената са дијагностикованим глиобластомом мултиформе, 15 са анапластичним, 14 са дифузним астроцитомом и 7 пацијената код којих је патохистолошки потврђена прогресија налаза из дифузног у анапластични астроцитом.

Из рада је искључено 5 пацијената и то: 2 пацијента са дијагностикованим анапластичним астроцитомом и 1 пацијент са дијагностикованим дифузним астроцитомом, због отежане интерпретације ADC мапа услед ефеката суцептибилности околног ткива и геометријске дисторзије изворних дифузијских снимака, као и артефаката насталих због померања пацијента. Из

рада је такође искључено 6 пацијенама са дијагностикованим глиобластомом услед присуства опсежних зона хеморагије.

За МР спектроскопију узету су само они пацијенти код којих је урађена МР спектроскопија са кратким и средњим временом еха, без обзира на примењену локализациону технику. При томе, издвојено је 7 пацијената са дифузним астроцитомом, 10 пацијената са анапластичним астроцитомом, 20 пацијената са глиобластомом мултиформе као и 9 пацијената са прогресијом тумора из дифузног у анапластични.

У циљу дијагностиковања и диференцијацији рекурентних тумора од терапијских секвела, псеудопрогресије и радијационе некрозе ГБМ анализирано је 40 пацијената и то 27 мушкараца и 13 жена, просечних година 51, који су лечени на Институту за онкологију и радиологију Србије у периоду од 2012.-2014.године.

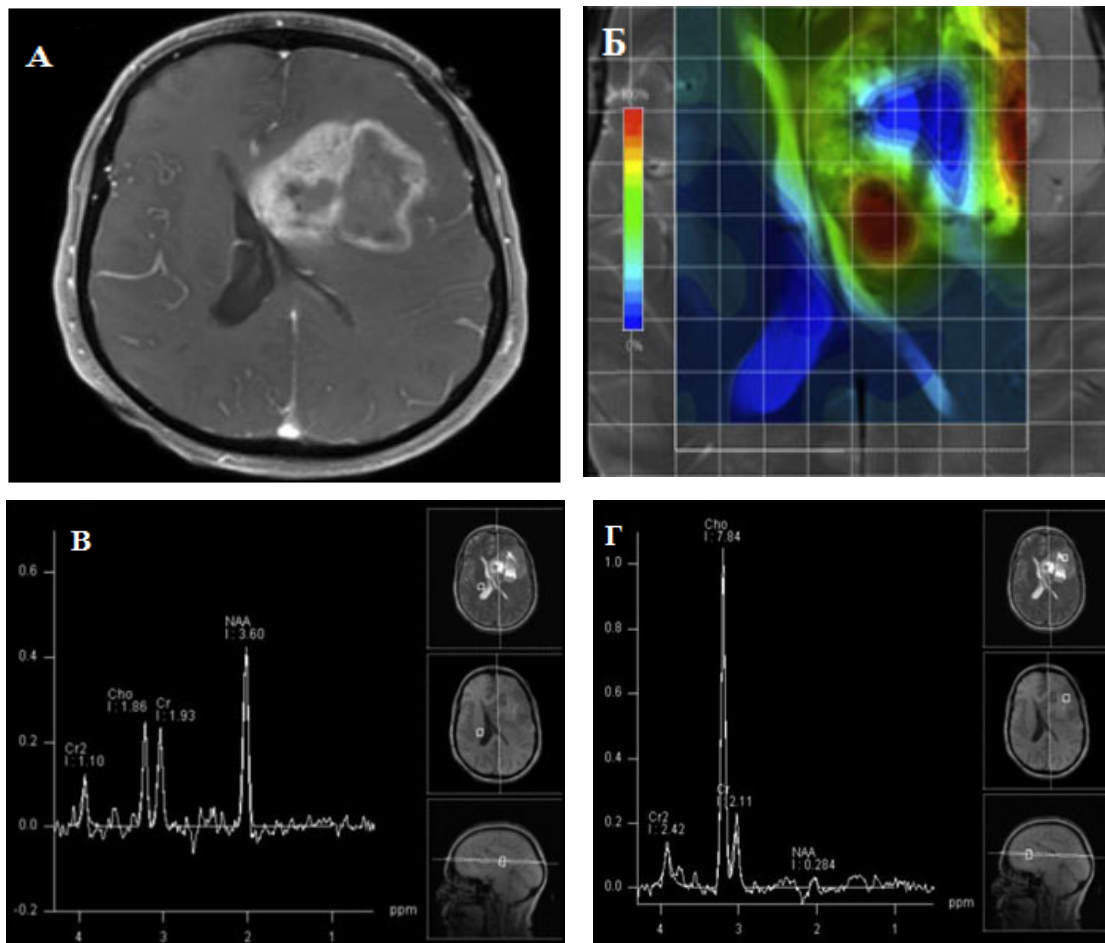
За фракталну анализу узето је 20 пацијената са дијагностикованим ГБМ и одређеним метилационим статусом. Код 8 пацијената је потврђена метилација промоторног региона гена који кодира Об гуанин метил трансферазу.

4.1.3 МР снимање

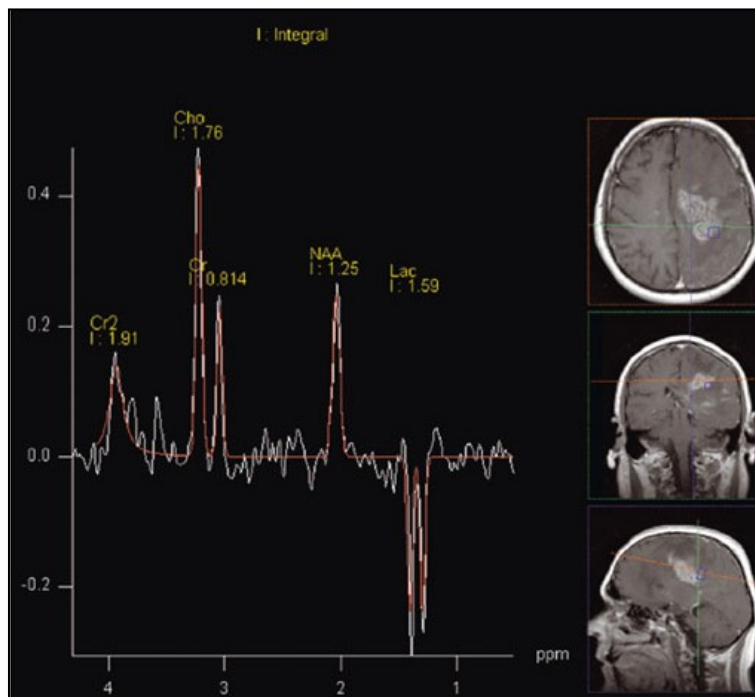
Снимања свих пацијената су спроведена на МРИ уређају јачине поља 1.5 Т (*Avanto Tim, Siemens Medical system, Erlangen, Germany*). Коришћена је 8 - канална завојница за главу. Приликом МРИ снимања пацијената са глијалним туморима у склопу клиничке обраде, у истом акту снимања додата је и дифузијски наглашена секвенца са аутоматским приказом мапа привидног дифузионог коефицијента. За снимање је коришћена ехо планарна (*Echo planar imaging- EPI*) дифузијски наглашена секвенца са следећим избором параметара снимања: TR=3800 ms, TE=89 ms, са 25 пресека, дебљине пресека 5 mm снимана у трансверзалној равни са применом дифузијских градијената у три међусобно ортогонална смера на три b вредности 0, 500, 1000 mm²s⁻¹. Осим наведене,

примењен је рутински МР протокол за снимање пацијената са сумњом на тумор ЦНС-а који обухвата T_2W , T_1W , T_2^*W у трансверзалној равни, FLAIR (*Fluid attenuated inversion recovery*) у коронарној равни, T_2W у сагиталној равни. Након апликације парамагнетног контрастног средства *Magnevist (gadopentetate dimeglumine, Bayer Healthcare, Bayer)* у дози од 0.01 mmol/kg телесне тежине урађена је 3D MPRAGE (*magnetization prepared rapid acquisition gradient echo*) секвенца у сагиталној равни и реконструкцијом у преостале две равни.

У току истог прегледа урађена је спектроскопија више воксела и/или спектроскопија једног и више воксела са средњим временом еха *PRESS* техником, као и са кратким временом еха *STEAM*. Параметри снимања за *CSI PRESS/STEAM* су: TR/TE 1500/135/30 ms, Field Of View (FOV) - 160×160×160 mm; VOI-80×80×80 mm. Величина воксела за *SVS* је варирао од 12-20 mm³ у зависности од величине и локализације испитиване лезије. (слика 16) За *STEAM* локализациону технику избор параметара је следећи: TR/TE 1600/30 ms (слика 17). Постконтрастни T_1W MPRAGE је коришћен за позиционирање VOI-ја у део лезије који се постконтрастно најинтензивније појачава у интензитету сигнала и/или показује FLAIR повишен интензитет сигнала.



Слика 16. Спектрална мапа холина добијена применом CSI локализационе технике позиционирања код пацијента са глиобластомом на T_1W MPRAGE (A). Највећа концентрација холина је представљена црвеном бојом на увећаној колор мапи (B). (B) Спектар добијен из воксела који не показује повишену концентрацију холина на мапи (плава боја) и (Г) спектар који потиче из дела обележеног црвеном бојом на колор мапи, који показује знатно повишену концентрацију холина.

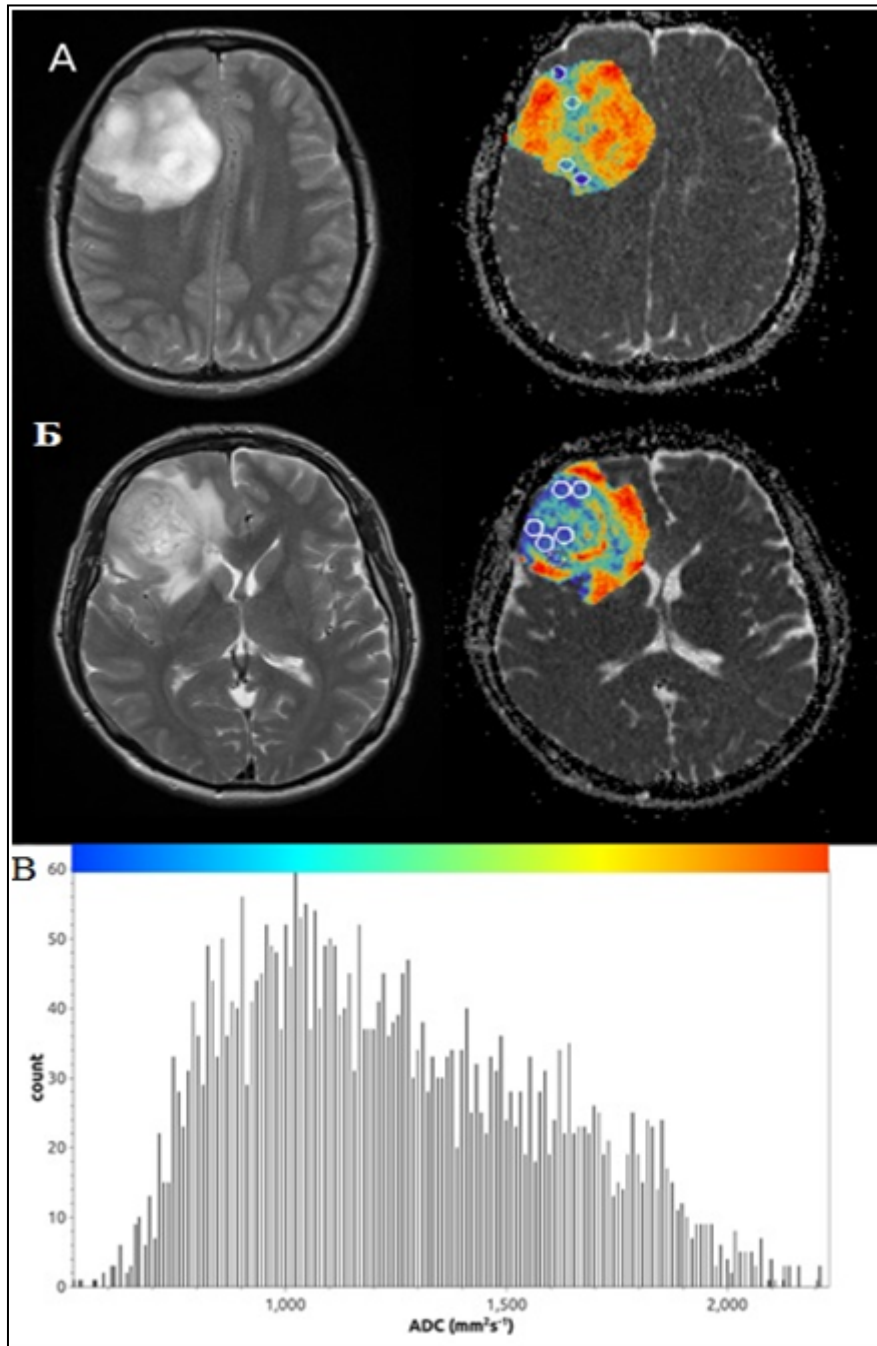


Слика 17. Позиционирање воксела и добијени спектар у спектроксији једног воксела са временом еха 135 ms малигног астроцитома градус 4.

4.1.3.1 Хистограмска анализа ADC мапа

Добијени МР снимци су пребачени на *PC* рачунар за даљу обраду и анализу. Анализа ADC мапа је урађена помоћу рачунарског програма MIPAV (*Medical Image Processing, Analysis and Visualisation version 4.3.1, Centar for Information technology (CIT), National Institute of Health (NIH)*).

У првом кораку анализе волумени од интереса (ВОИ) су на ADC мапама ручно дефинисани, тако да одговарају зонама повишеног интензитета сигнала на T2W/FLAIR снимцима (*“Match images” alghoritm in Mipav*). Приликом дефинисања ВОИ-ја искључене су зоне хеморагије или калцификација према T₂*W и T1W снимцима (*слика 18*). Затим су добијени ADC хистограми са колор мапама као индикатор за постављање примарног РОИ-ја у зонама тумор које су приказане плавом бојом, као зоне најнижег интензитета сигнала. Укупно је постављено 6 РОИ-ја са величином од 12 пиксела. За добијање параметара ADC, Δ ADC (стандардна девијација ADC) и K (куртозис фактор) су коришћене средње вредности појединачно добијених РОИ-ја.



Слика 18 Пример позиционирања ROI-ја у регији тумора на основу хистограмских колор мапа за дифузни астроцитом (А), ГБМ (Б) В)
Хистограмска анализа тумора приказаног на 17Б.

4.1.3.2 Хистограмска анализа на сегментираним ADC снимцима

Дефинисани волумен од интереса у случају семи-аутоматске сегментације урађен је применом кластеризације *fuzzy C-means single channel* јер се анализа врши само на ADC мапама за дефинисани РОИ на свим пресецима.

Према природној подели анатомских структура анализираних астроцитоме, изабрани број кластера за дифузне и анапластичне астроцитоме је 3. Иако су анапластични тумори најхомогенији изабрана су 3 кластера, како би се могло извршити поређење са групом пацијената код којих је дијагностикована прогресија налаза из нижег у виши градус. За ГБМ број дефинисаних кластера је 4, пре свега због изузетне хетерогености овог тумора, који поред солидног дела тумора и зона едема, такође може садржати и зоне микронекрозе/микрехеморагије. Тако би добијени кластери одговарали одређеној компоненти тумора; кластер 1 - вијабилном делу тумора, кластер 2 – у зависности од хетерогености вијабилни део тумора и едем, кластер 3 - перитуморси едем, као и кластер 4 код ГБМ. Вредност експонента је 2 према стандарним подешавањима, као и праг толеранције који износи 0.01. За овако изабране параметаре максимални број итерација је 100 како би се постигла сегментација ВОИ-ја за што краће време.

Након извршене сегментације извршена је хистограмска анализа на запремини од интереса која обухвата читаву запремину тумора, али и за сваки кластер (сегмент) посебно.

Из овако добијених хистограма одређени су следећи параметри: центар хистограма, који представља ADC вредност, ширина пика на половини максимума његове висине – (*FWHM*), која описује хетерогеност у датом кластеру и висина максимума хистограма, број пиксела који одговара датом положају пика. Што је већи број пиксела већа је целуларност. Анализа добијених

хистограма је рађена рачунарским програмом *Fityc Version 0.9.8 M. Wojdyr, J. Appl. Cryst. 43, 1126 (2010) [118]*.

4.1.3.3 Анализа МР спектра и праћење терапијског одговора глиобластома

За обраду МР спектра су коришћени рачунарски програми *jMRUI Version 4.0* и *TARQUIN (Totally Automatic Robust Quantitation in NMR) Version 4.2.10*.

Воксели који су узети у анализу су бирани унутар тумора на основу МР слика, добијених спектра, али и на основу извршене кластерске анализе, тако што су поређени изабрани воксели са добијеним структурама у кластеру, како би се избегла грешка при одабиру воксела и утицај парцијалног запреминског ефекта. Такође, изабрани су воксели и контралатерално у здравом мозданом ткиву ради поређења добијених резултата.

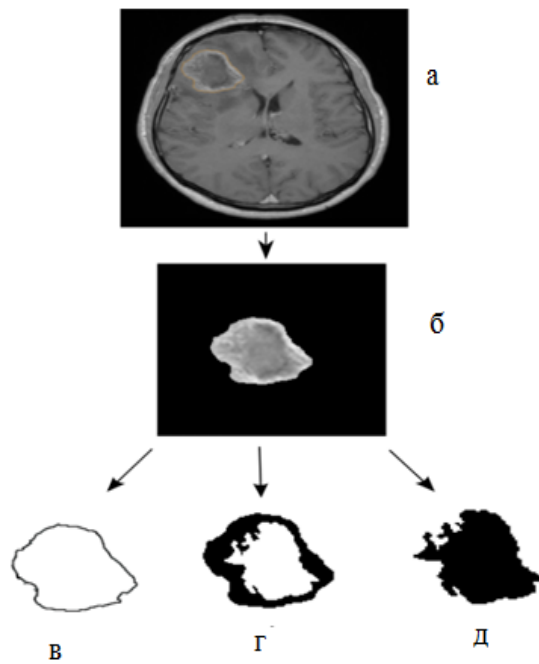
Изабрани спектри су аутоматски квантификовани помоћу рачунарског програма *TARQUIN* чији се алгоритам састоји из три дела; први део је аутоматска обрада спектра која обухвата примену *HLSVD* filtera (*Hankel Lanczos singular value decomposition*) у региону [4.5-5ppm] како би се уклонио сигнал воде, корекција базне линије, подешавање фазе у односу на доминантне пикове NAA, Cho и Cr, други део алгоритма се односи на симулацију обрађеног спектра и као трећи део алгоритма је фит нелинеарном методом најмањих квадрата. Квантификација је урађена за следеће резонанције: липиди (1.3 ppm), лактат који се јавља као дублет на око 1.35 ppm, Н-ацетил аспартат (2.02 ppm), глутамат +глутамин (2.35 ppm), креатин (3.03 ppm), холин и једињења која садрже холин (3.20 ppm) и глицин/миоинозитол (3.55 ppm). Због мултиплих параметара урађен је Kruskal-Wallis тест како би се добиле резонанције које показују статистичку значајност. Само оне резонанције које су имале $p < 0.001$ коришћене су као улазни параметри за Линерану дискриминантну анализу. ЛДА је рађена у софтверском пакету *Matlab верзија R10*. Приликом ЛДА су се на основу претходно издвојених

резонанција испитивали тачно дефинисани сегменти спектра и то: mI/Gly ([3.450,3.680] ppm), Cho ([3.115,3.265] ppm), Glx ([2.270,2.510] ppm), NAA ([1.935,2.085] ppm), Lac ([1.235,1.385] ppm), Lip ([1.125,1.275] ppm).

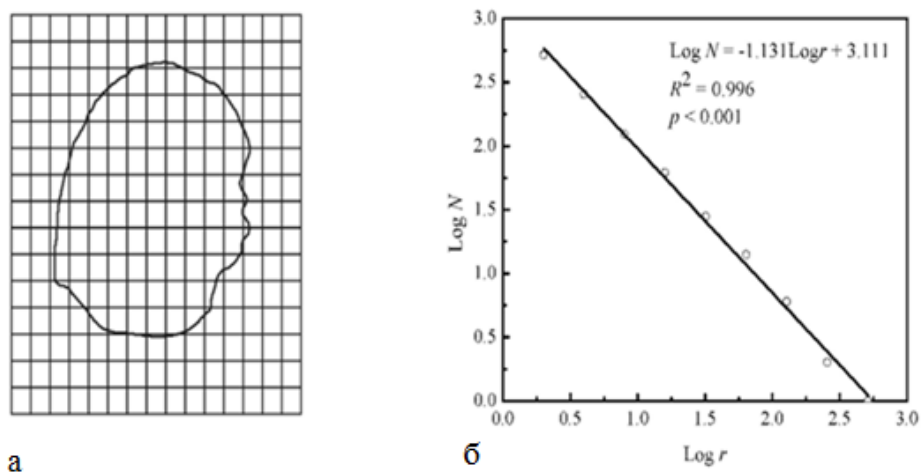
4.1.4 Субдиференцијација подтипова глиобластома

4.1.4.1 Фрактална анализа у одређивању метилационог статуса глиобластома

Фрактална анализа је рађена у *Image J (The National Institute of Health, USA)* комерцијалном софтверу методом пребројавања квадрата. Величина квадрата је узета од 2 до 256, 512, 1024 пиксела, у зависности од величине слике (слика 19). Анализирани су следећи параметри: фрактална димензија (*fractal dimensions of area (fA)*), површина контуре (*contour encompassing outer borders of contrast enhancement (fC)*), површина постконтрастног појачања (*area occupied by contrast enhancement, (fA)*), као и параметар циркуларности (*circularity parameter (Cy)*) (слика 20). Хомогеност узорка је испитивана *Shapiro-Wilk and Levine's* тестовима у *R* софтверском пакету.



Слика 19 Декомпозиција тумора и некрозе на основу T_1W снимка. Приказан је постконтрастни T_1W снимак ГБМ-а (А), површина и контура тумора (Б, В), као и зона постконтрастног појачања (Г) и некрозе (Д).



Слика 20 Добијање фракталне димензије применом методе пребројавања квадрата. Слика се прекрива квадратима (а), а са $\log\text{-}\log$ криве (б) добија се апсолутна вредност фракталне димензије као нагиб криве

5. Резултати

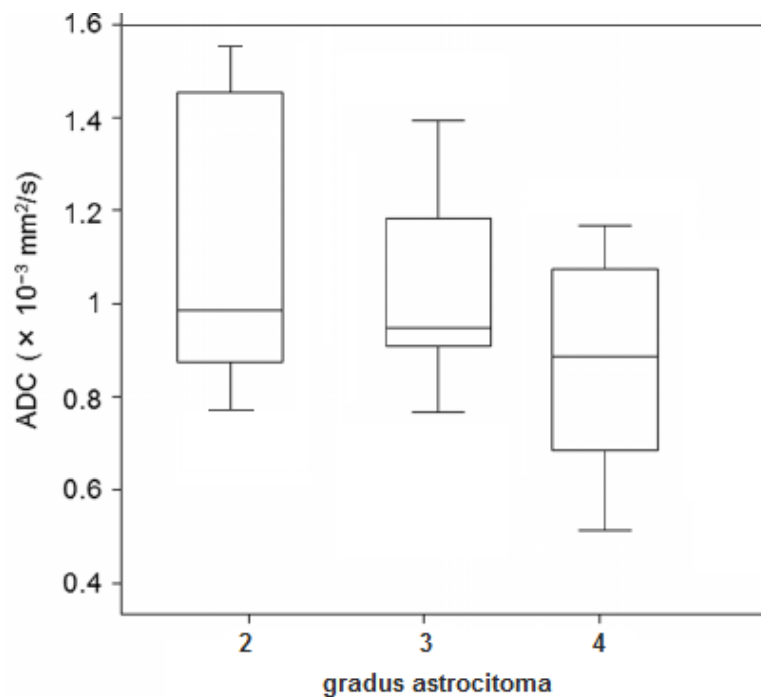
5.1 Дифузијски наглашено снимање

У табели 1 су приказане минималне, максималне и средње вредности ADC-а добијене класичном анализом ADC мапа. Регион од интереса је постављен у вијабилном делу тумора, перифокалном едему и некротичном делу тумора. Графички приказ средњих вредности ADC-а за различите градусе астроцитомата дат је на *слици 21*. Није нађена статистички значајна разлика између различитих градуса астроцитомата.

Табела 1 Средњи, минимални и максимални ADC у различитим деловима тумора.

ADC±SD/10 ⁻³ mm ² s ⁻¹	Дифузни астроцитом	Анапластични астроцитом	Глиобластом мултиформе
минимум _т	961±164	942±232	883±151
максимум _т	1531±223	1312±215	1112±212
средња вредност _т	1246±193	1027±206	986±274
минимум _е	1413±205	-	1497±244
максимум _е	1736±183	-	2070±350
средња вредност _е	1595±245	-	1691±250
минимум _н	-	-	718±219
максимум _н	-	-	932±260
средња вредност _н	-	-	819±228

***т**-тумор, **е**-перитуморски едем, **н**-некроза



Слика 21 Графички приказ средњих вредности ADC-а добијених класичном анализом ADC мапа за различите градусе астроцитоме. Регион од интереса постављен у зони вијабилног дела тумора.

5.1.1 Анализа локалних хистограма ADC мапа

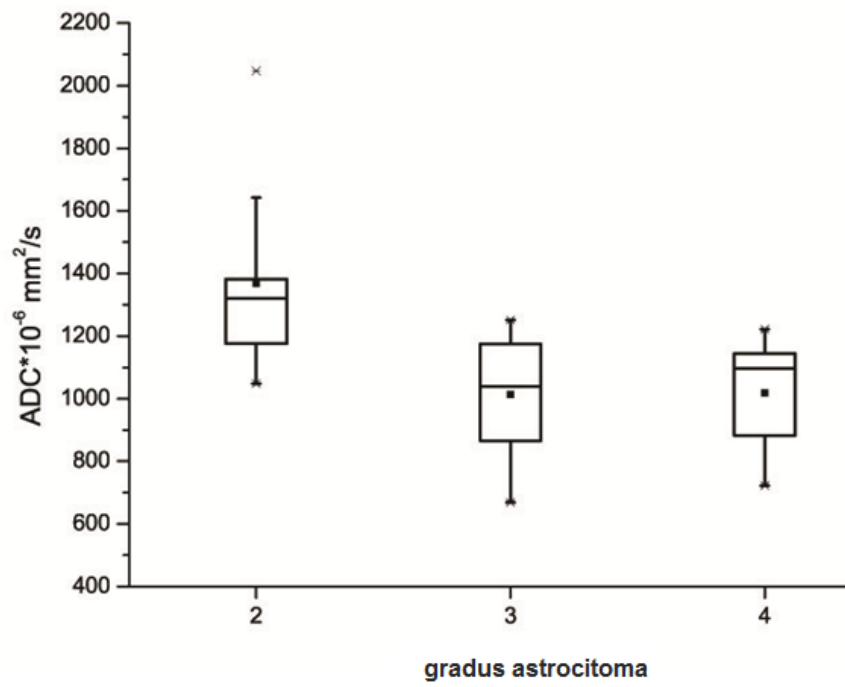
У табелама 2 и 3 су приказане добијене ADC вредности, грешка мерења ADC (Δ ADC) вредности, као и куртозис фактор астроцитоме различитог степена малигности, постављањем РОИ-ја у зоне сниженог интензитета сигнала на ADC мапи.

Табела 2 Средње вредности ADC, Δ ADC и K за различите градусе астроцитоме.

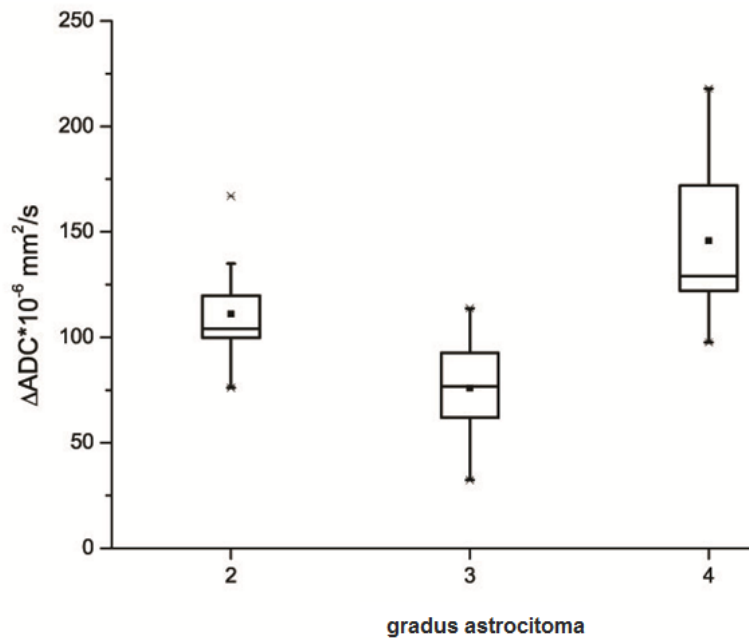
	ADC · 10 ⁻³ mm ² s ⁻¹	Δ ADC · 10 ⁻³ mm ² s ⁻¹	K
Дифузни астроцитом	1308±275	111±33	2.8±0.7
Анапластични астроцитом	1013±217	76±24	2.4±0.4
Глиобластом мултиформе	1019±183	145±41	3.1±0.9

Значајна статистичка разлика нађена је између астроцитоме градуса 2 и 3 ($p < 0.01$), као и градуса 2 и 4 ($p < 0.02$), док на основу ових мерења није било могуће разликовати подтипове високоградусних тумора. Праћењем добијених вредности за Δ ADC, може се уочити да на основу добијених средњих вредности можемо разликовати градус 2 од градуса 3 ($p < 0.05$) као и градус 3 од градуса 4 ($p < 0.001$). Резултати добијени за K указују на сличан тренд као и код Δ ADC, на основу чега можемо разликовати само градус 3 и 4 ($p < 0.05$), али не и нискоградусне од високоградусних тумора.

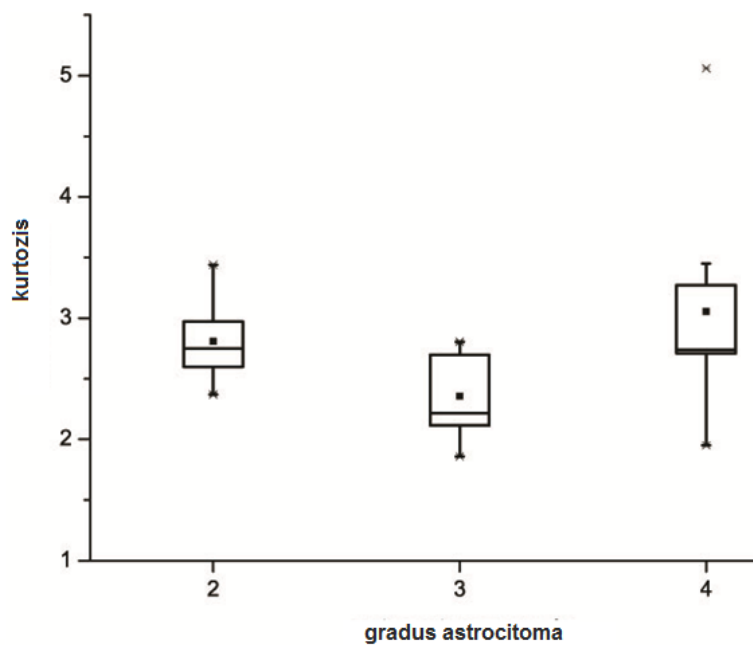
Резултати су приказани на *сликама 22, 23 и 24*.



Слика 22 Графички приказ добијених ADC вредности за различите градусе астроцитума. Региони од интереса су постављани тамо где је добијена минимална вредност ADC-а.



Слика 23 Графички приказ добијених ΔADC вредности за различите градусе астроцитоме. Региони од интереса су постављени тамо где је добијена минимална вредност ADC -а.



Слика 24 Графички приказ добијених вредности куртозис фактора за различите градусе астроцитоме. Региони од интереса су постављени тамо где је добијена минимална вредност ADC -а.

У табели 3 су приказане специфичности и сензитивности одређивања DWI параметара за различите типове астроцитома.

Табела 3 Резултати ROC анализеза различите градусе астроцитома

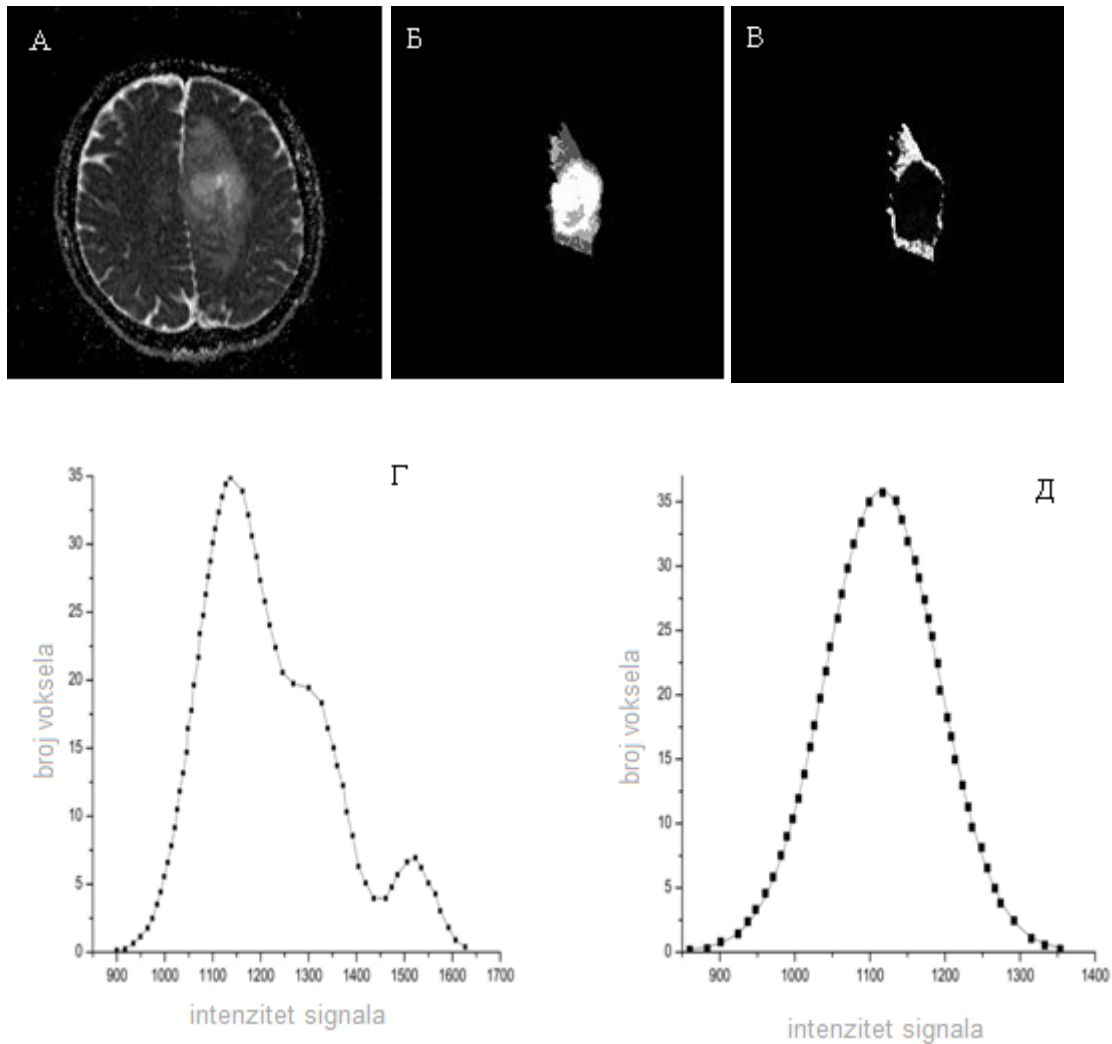
Параметар	<i>AUC</i>	<i>P</i>	Гранична вредност	сензитивност (%)	специфичност (%)
Разликовање астроцитома градуса 2 и градуса 3					
<i>ADC</i>	0.88	0.01	$1.211 \cdot 10^{-3}$	78	78
ΔADC	0.85	0.007	$0.1 \cdot 10^{-3}$	78	89
<i>K</i>	0.78	0.047	2.76	57	78
Разликовање астроцитома градуса 3 и градуса 4					
<i>ADC</i>	0.469	>0.9	$1.100 \cdot 10^{-3}$	67	56
ΔADC	0.975	0.001	$0.17 \cdot 10^{-3}$	100	89
<i>K</i>	0.784	0.042	2.71	78	78

Разликовање подтипова високоградусних тумора се може постићи анализом ΔADC и *K* и то са сензитивношћу од 100,% и специфичношћу од 89%, односно сензитивношћу од 78% и специфичношћу од 78%, редом.

5.1.2 Вредности *ADC*, *FWHM* и висине пика за различите градусе тумора у кластеру 1

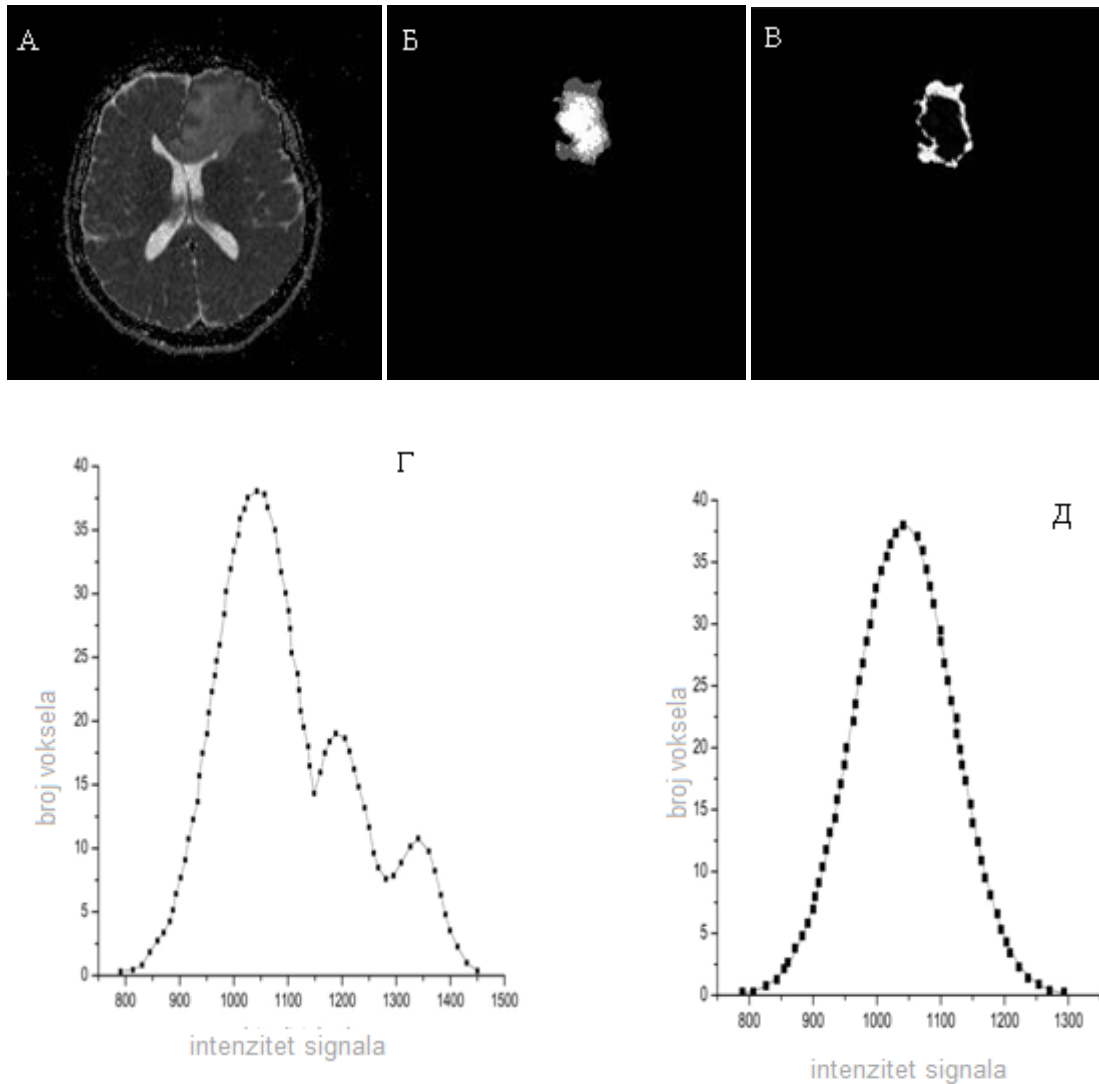
На сликама 25, 26 и 27 су приказане *ADC* мапе различитих типова астроцитних тумора пре и након примене FCM технике сегментације као и добијени хистограми у случају када ВОИ обухвата цео тумор односно део тумора који припада првом кластеру.

Дифузни астроцитом



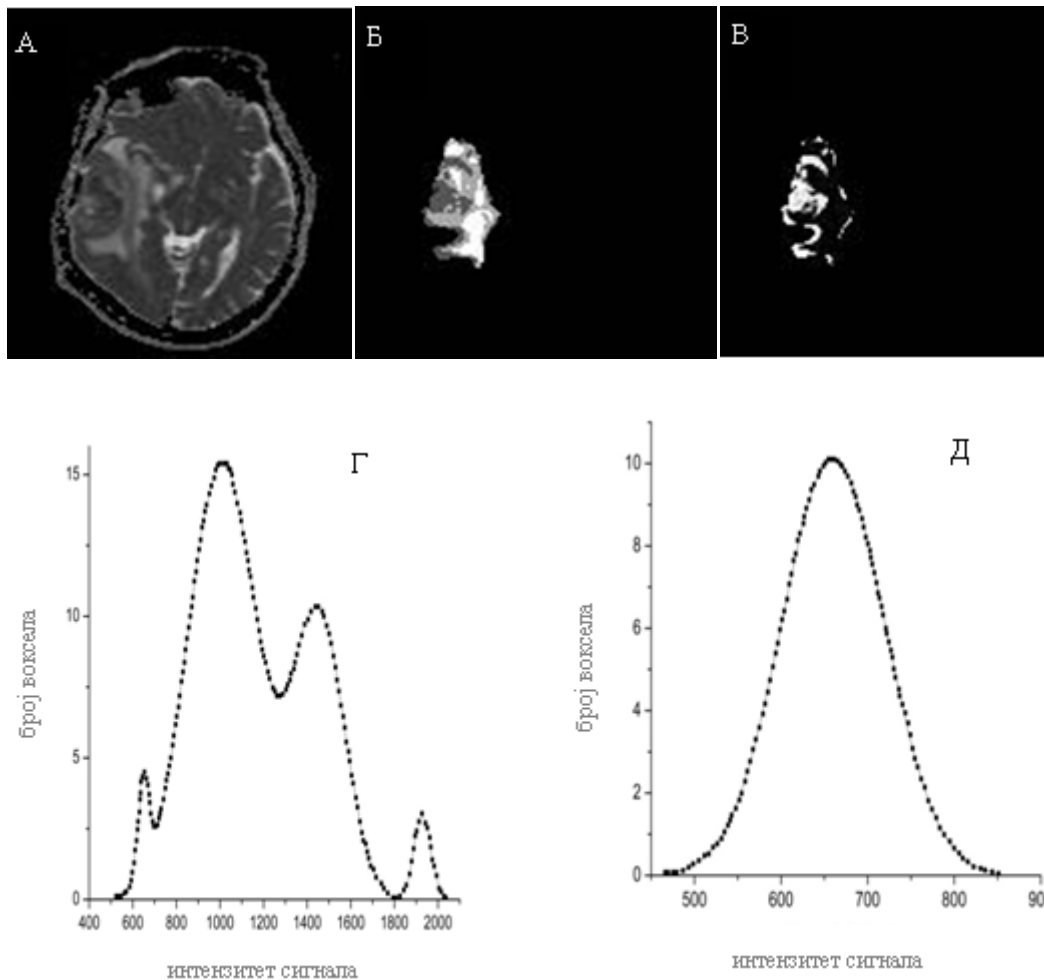
Слика 25 Сегментација и добијени хистограми дифузног астроцита. Слика А приказује ADC мапу, док на сликама Б и В је приказан тумор након кластеризације када ВОИ обухвата читаву запремину тумора (Б), и компоненту првог кластера (В). Хистограми овако дефинисаних ВОИ-ја су приказани на сликама Г и Д.

Анапластични астроцитом



Слика 26 Сегментација и добијени хистограми анапластичног астроцита. Слика А приказује ADC мапу, док на сликама Б и В је приказан тумор након кластеризације када ВОИ обухвата читаву запремину тумора (Б), и комоненту првог кластера (В). Хистограми овако дефинисаних ВОИ-ја су приказани на сликама Г и Д.

Глиобластом мултиформе



Слика 27 Сегментација и добијени хистограми глиобластома мултиформе. Слика А приказује ADC мапу, док на сликама Б и В је приказан тумор након кластеризације када ВОИ обухвата читаву запремину тумора (Б), и компоненту првог кластера (В). Хистограми овако дефинисаних ВОИ-ја су приказани на сликама Г и Д.

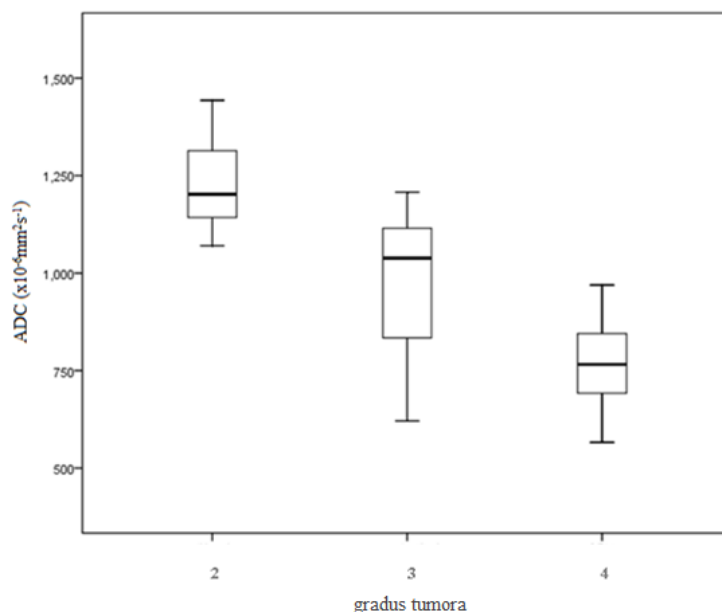
На основу приказаних слика запажа се појава мултиплих пикова код свих типова астроцитних тумора када се анализира читава запремина тумора. Међутим, након сегментације хистограми добијени за компоненту тумора која припада првом кластеру указују на присуство једног пика који има нормалну расподелу.

ADC

Добијене средње ADC вредности за астроцитом градуса 2, 3 и 4 су $1185.7 \pm 216.9 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$, $1008.6 \pm 199.3 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$, $8137.8 \pm 126.2 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ редом.

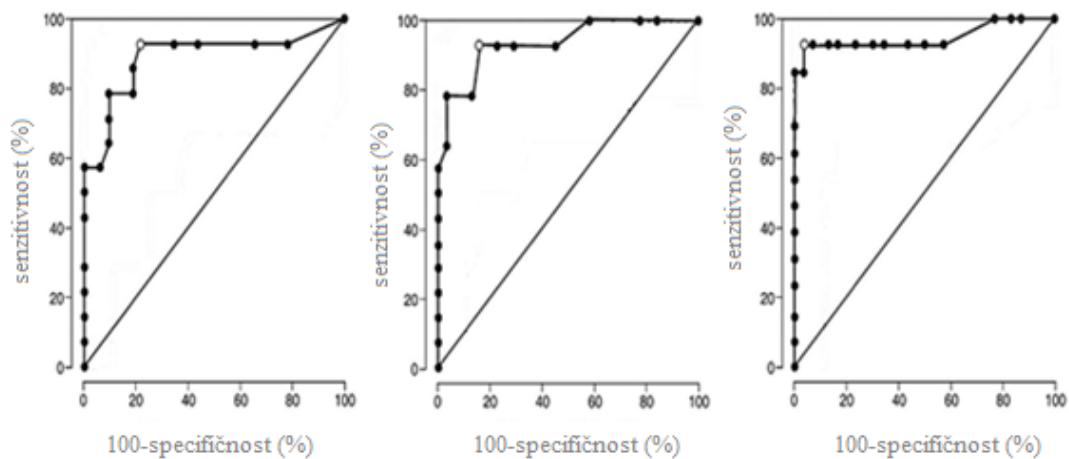
Статистички значајна разлика ADC вредности између дифузних и анапластичних астроцита је $p=0.014$, док је за анапластичне и ГБМ $p=0.039$, а за дифузне и ГБМ $p=0.001$. Пирсоновом корелацијом је добијена негативна зависност ADC вредности од градуса тумора. Пирсонов коефицијент износи $-0.810 \sim 1$; $p < 0.05$.

У низу од дифузног ка ГБМ долази до континуираног опадања ADC вредности. Континуирани пад ADC-а одговара повећању ћелијске пролиферације у низу од дифузног ка ГБМ. Стандардне девијације за ДА и ГБМ су приближно уједначене, док је за анапластични астроцитом она нешто већа, што указује на већу варијабилност вредности унутар ове групе. Према добијеним ADC вредностима у првом кластеру могу се разликовати астроцитни тумори (слика 28).



Слика 28 ADC вредности у првом кластеру добијене за различите типове астроцитних тумора.

Сензитивност методе за раздвајање ДА од ГБМ је 94%, док је специфичност 76%. Сензитивност од 89% је постигнута у разликовању АА и ГБМ је, док је специфичност 80% . Сензитивност разликовања ДА и ГБМ је 90%, а специфичност је 81% (слика 29), што је знатно боље у поређењу са резултатима који се добијају за ADC мереном у РОИ—ју постављеном на основу најнижег интензитета сигнала ADC на мапама (види табеле 2 и 3).



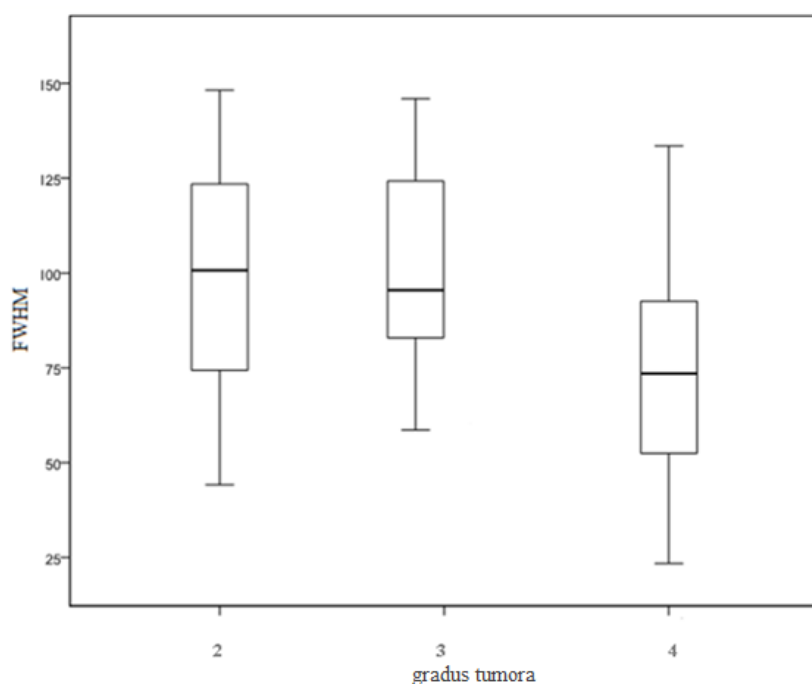
Слика 29 Криве средњих вредности привидног дифузионог коефицијента које показују сензитивност и специфичност разликовања ДА и АА, АА и ГБМ, као и ДА и ГБМ, редом

FWHM

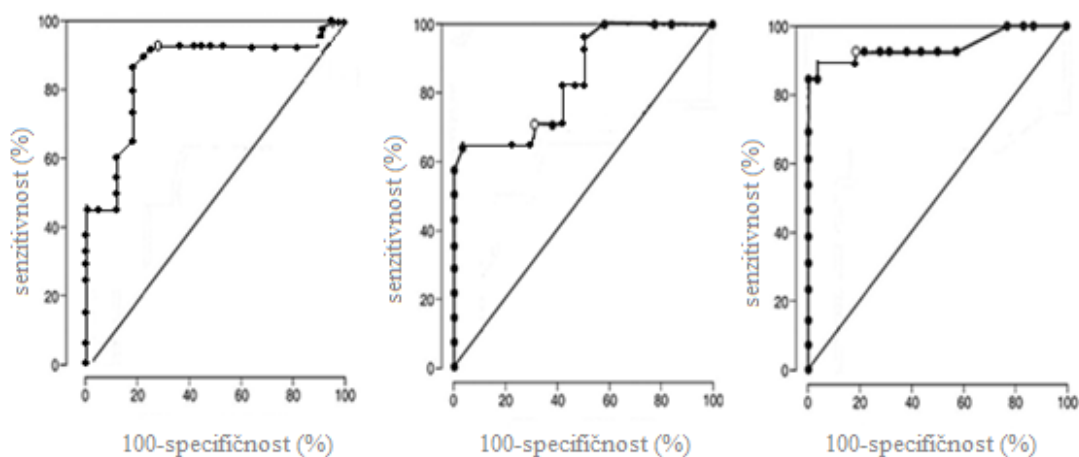
Ширина линије за астроцитом градуса 2, 3 и 4 је $99.45 \pm 36.71 \text{ mm}^2/\text{s}$, $92.61 \pm 29.32 \text{ mm}^2/\text{s}$, $80.78 \pm 29.42 \text{ mm}^2/\text{s}$, редом. На основу добијених вредности могу се разликовати ДА од ГБМ као и АА од ГБМ, али се са сигурношћу не може разликовати ДА од АА. Мања разлика између градуса 2 и 3 може бити последица веће хомогености ова два типа тумора у односу на ГБМ (слика 30).

Пирсонов тест указао је на постојање негативне корелације између FWHM и градуса тумора, али без статистичке значајности $p > 0.05$. Пирсонов коефицијент у овом случају износи -0.438 .

Применом ANOVA-е утврђено је постојање статистички значајне разлике у FWHM вредностима између дифузних астроцитома и ГБМ ($p=0.016$), и између анапластичних астроцитома и ГБМ ($p=0.045$).



Слика 30 FWHM вредности различитих градуса астроцитома.

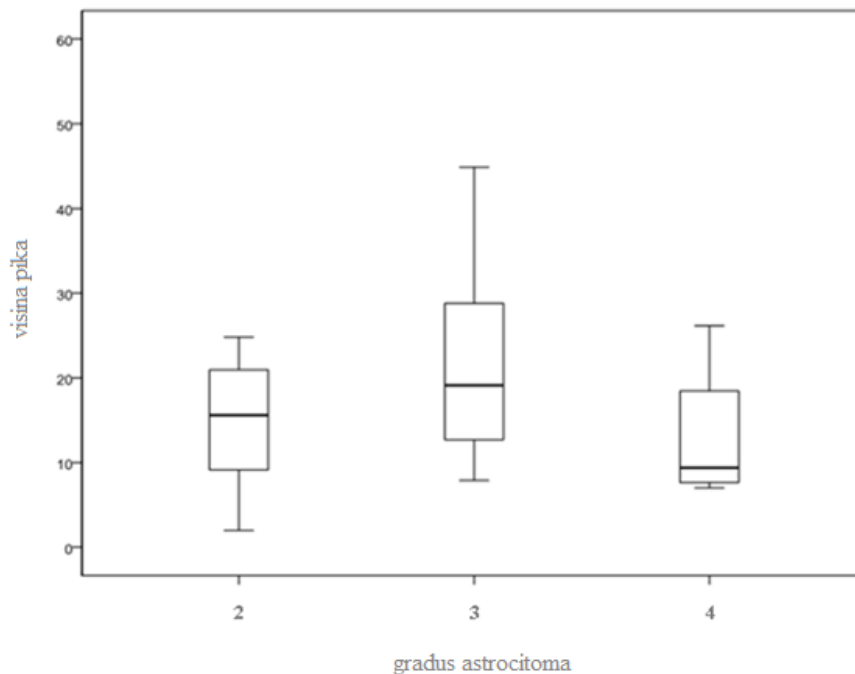


Слика 31 Криве средњих вредности ширине линије које показују сензитивност и специфичност разликовања ДА и ГБМ, ДА и АА, као и АА и ГБМ, редом.

Сензитивност разликовања ДА од ГБМ базираног на вредностима ширине линија је 93%, док је специфичност 77%. Сензитивност за разликовање ДА од АА је 77%, док је специфичност 70%. Сензитивност за разликовање АА од ГБМ је 90%, док је специфичност 80% (слика 31).

Висина пика хистограма

Висина пика хистограма за астроцитом градуса 2, 3 и 4 је 16.41, 21.09, 14.39, редом. На основу добијених вредности се могу разликовати АА од ГБМ, али се са сигурношћу не могу разликовати остали градуси тумори (слика 32). Пирсонов тест указао је на постојање негативне корелације висине пика хистограма и градуса тумора, али без статистичке значајности ($p > 0.05$). Пирсонов коефицијент износи -0.467.



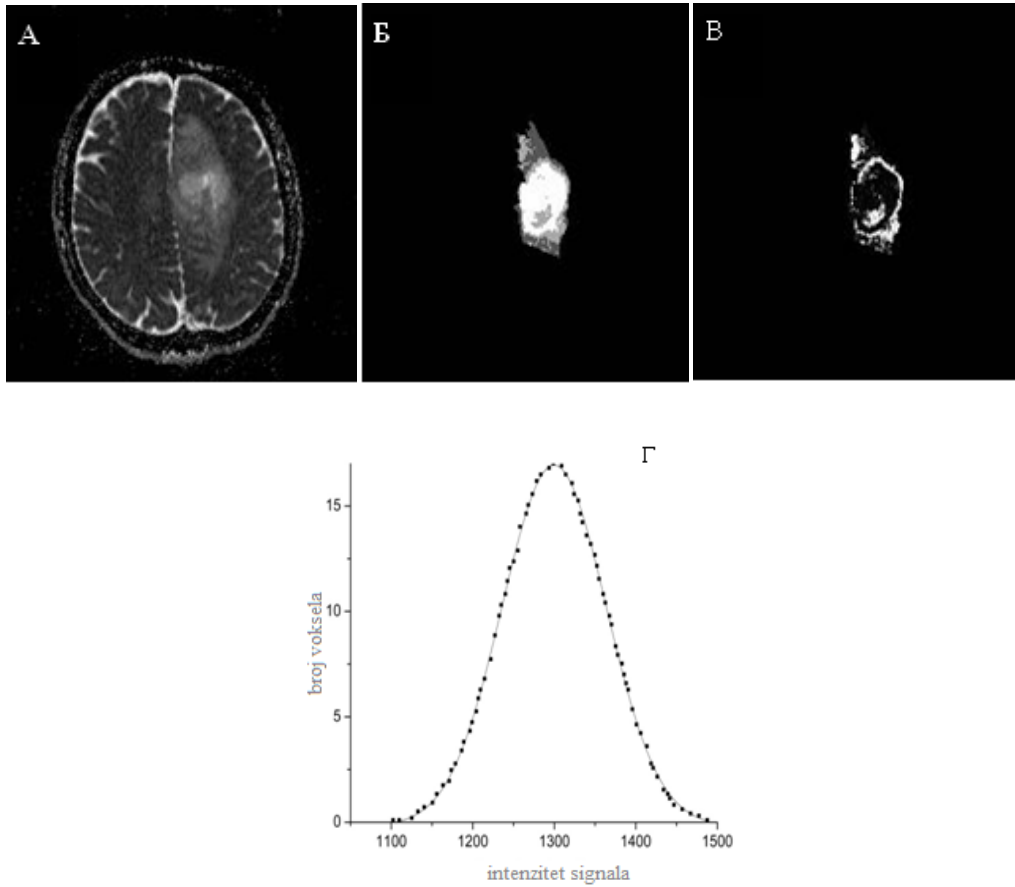
Слика 32 Вредности висина пика астроцитних тумора различитог градуса.

Статистички значајна разлика висине пика између анапластичних и ГБМ је $p=0.032$. Висина пика је повезана са хетерогеношћу и целуларношћу тумора. Највише вредности висине пика имају анапластични астроцитоме, а најниже ГБМ. Сензитивност и специфичност разликовања АА од ГБМ базирана на вредностима висине пика хистограма је 73% и 68%, редом.

5.1.3 Вредности ADC, FWHM висине пика за различите различите градусе тумора у кластеру 2

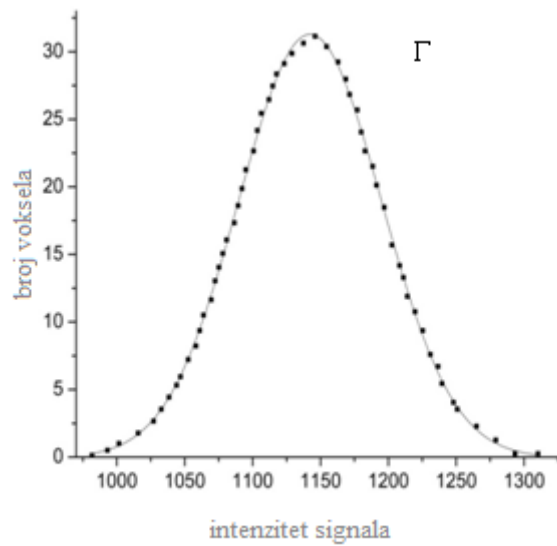
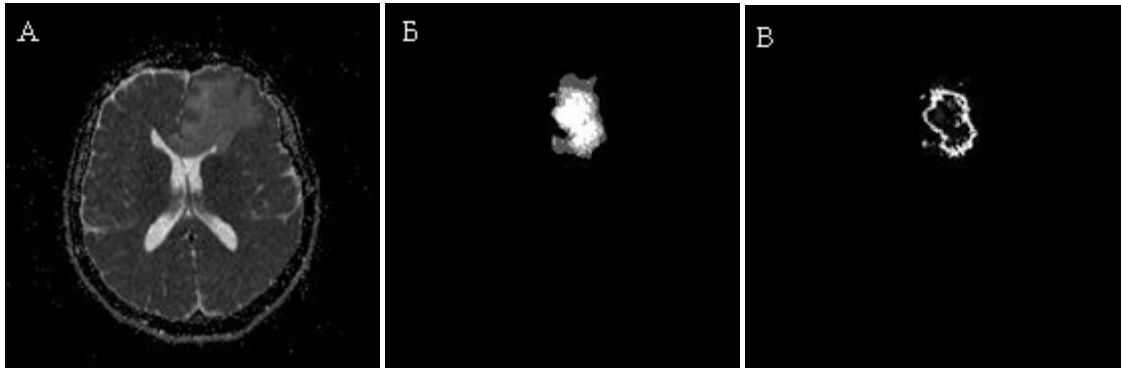
На *сликама 33, 34 и 35* су приказане ADC мапе астроцитних тумора, пре и након примене FCM технике сегментације као и добијени хистограми читаве запремине и дела тумора издвојеног у другом кластеру.

Дифузни астроцитом



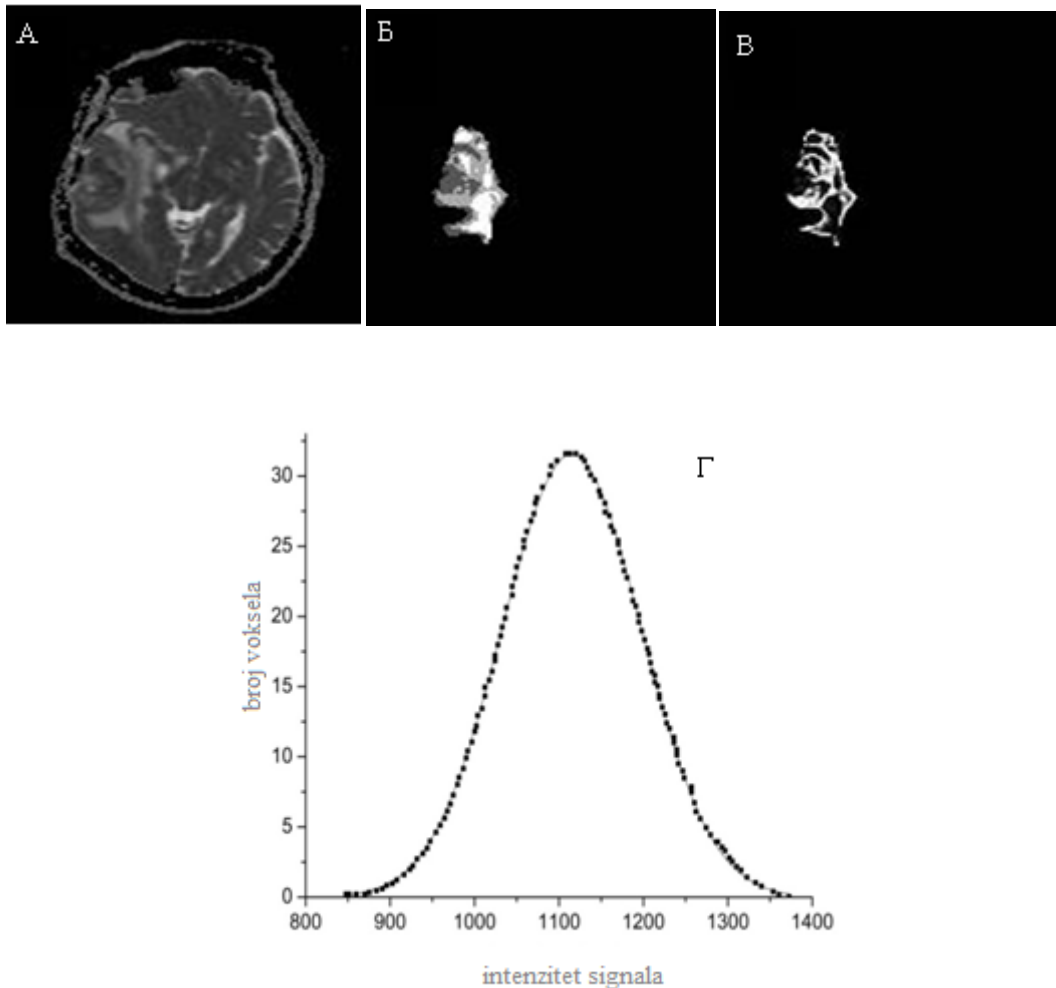
Слика 33 ADC мапа дифузног астроцитома (А), тумор након сегментације FCM техником (Б), као и део тумора који је издвојен као први кластер (В). На слици Г је приказан добијени хистограми који одговара анализи другог кластера.

Анапластични астроцитом



Слика 34 ADC мапа анапластичног астроцитом (А), тумор након сегментације FCM техником (Б), као и део тумора који је издвојен као први кластер (В). На слици Г је приказан добијени хистограми који одговара анализи тумора издвојеног у другот кластеру.

Глиобластом мултиформе



Слика 35 ADC мапа глиобластома мултиформе (А), тумор након сегментације FCM техником (Б), као и део тумора који је издвојен као први кластер (Б). На слици Г је приказан добијени хистограми који одговара анализи компоненте тумора издвојене у другом кластеру.

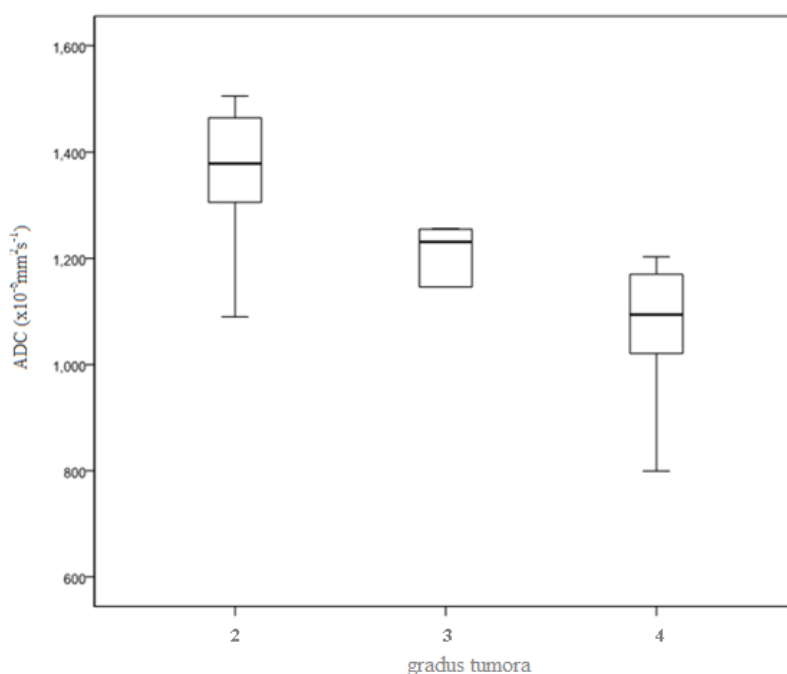
ADC

Добијене ADC вредности за астроцитоме градуса 2, 3 и 4 у другом кластеру су: $1317.9 \pm 16.12 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$, $1162.0 \pm 22.29 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$, $1082.6 \pm 22.52 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ редом. На основу добијених вредности се са сигурношћу могу разликовати нискоградусни од високоградусних тумора. Може се приметити да су добијене вредности ADC-а за анапластични астроцитом приближно исте као

оне добијене у кластеру 1 (за први кластер су добијене вредности $1008.6 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$), са малим варијацијама вредности унутар групе, што указује на донекле ограничавајућу могућност примене техника сегментације код хомогених тумора какав је АА (слика 36).

Статистички значајна разлика ADC вредности је добијена између ДА и ГБМ, $p=0.023$, што се може приписати већој целуларности код ГБМ-а.

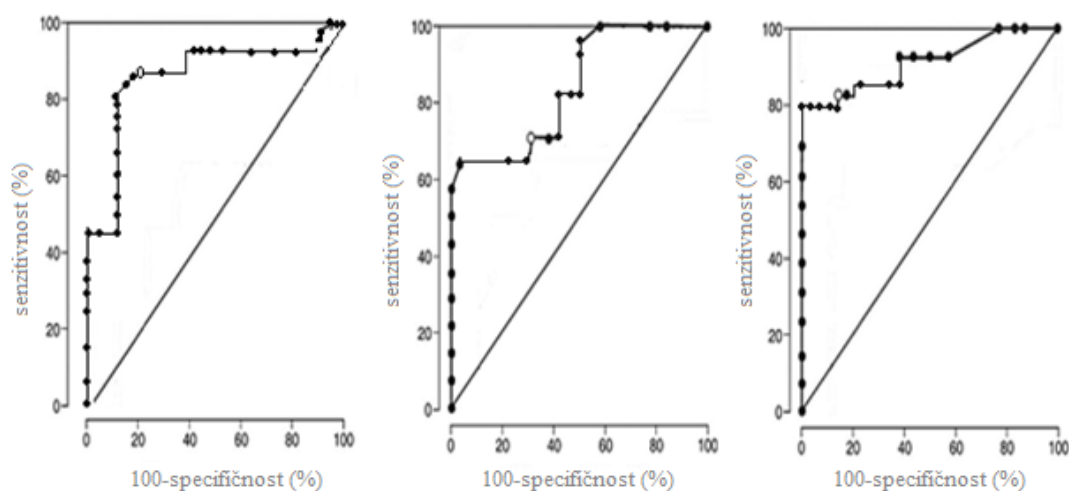
Пирсоновим тестом је добијена негативна корелација ADC-а и градуса тумора ($p<0.05$). Пирсонов коефицијент износи -0.711 .



Слика 36 ADC вредности добијене у другом кластеру за различите градусе астроцитома.

Сензитивност методе за разликовање дифузних од анапластичних астроцитома на основу измерених ADC вредности је 88%, док је специфичност

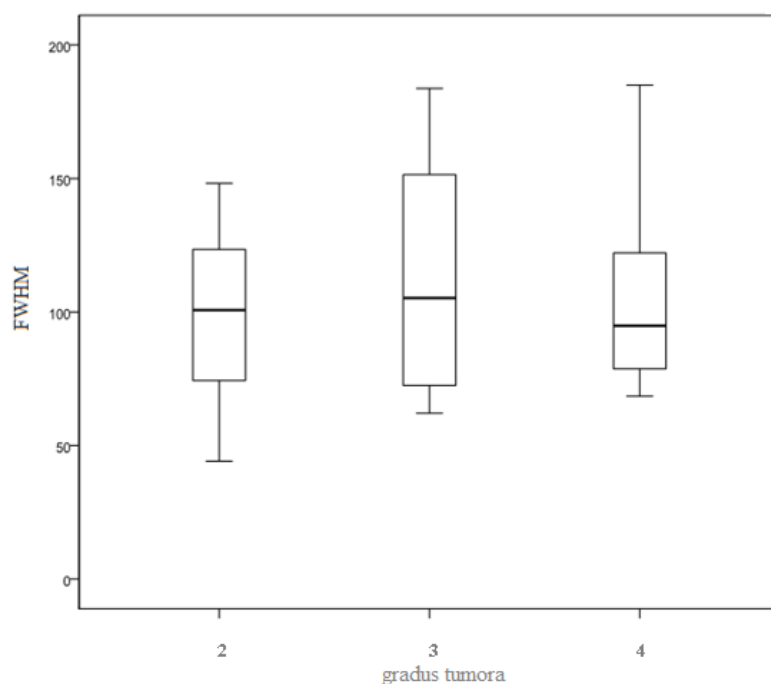
80%. Сензитивност за разликовање анапластичних и ГБМ је 78%, а специфичност је 70%. Сензитивност за разликовање ДА и ГБМ је 82%, док је специфичност 87.5% (слика 37).



Слика 37 Криве средњих вредности привидног дифузионог коефицијента које показују сензитивност и специфичност разликовања ДА и АА, АА и ГБМ, као и ДА и ГБМ, редом.

FWHM

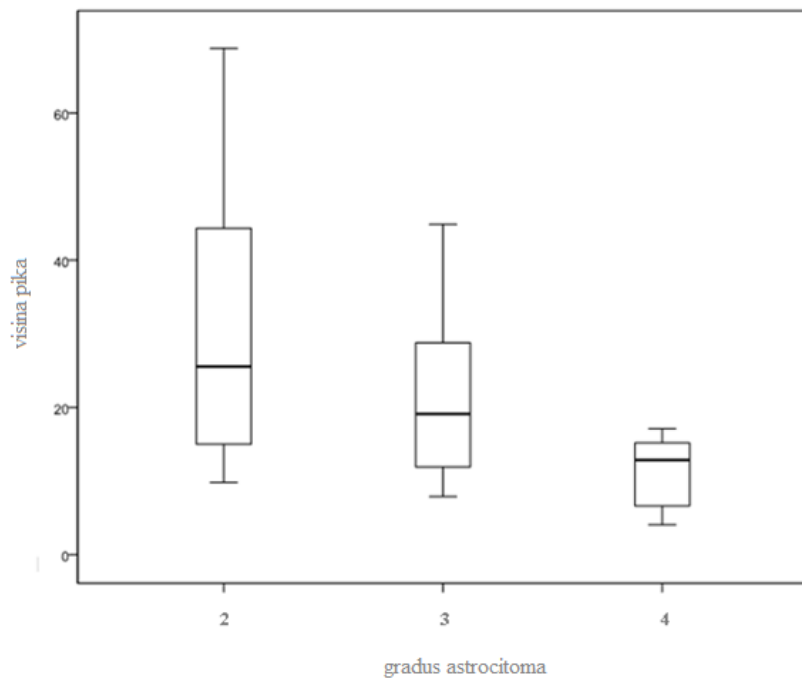
Ширина пика на половини његове висине која је добијена у другом кластеру за астроцитом градуса 2, 3 и 4 износи $92.61 \pm 34.82 \text{ mm}^2/\text{s}$, $110.62 \pm 42.00 \text{ mm}^2/\text{s}$, $103.27 \pm 39.97 \text{ mm}^2/\text{s}$, редом. Вредности су доста сличне као и код првог кластера, што указује на мешани однос компонената унутар овог кластера. Највећа варијација вредности се запажа код АА, док је код ДА и ГБМ нешто мања (слика 38). Међутим, велика стандардна девијација ГБМ-а и наведена варијабилност вредности у појединим групама, чини поуздану диференцијацију између астроцитома различитог градуса неизводљивом.



Слика 38 FWHM вредности у другом кластеру за различите типове астроцитоме.

Висина пика хистограма

Висина пика у другом кластеру за астроцитоме градуса 2, 3 и 4 су 27.26 ± 19.84 , 21.55 ± 12.48 , 15.64 ± 10.11 редом. На основу добијених вредности се не могу разликовати групе астроцитних тумора. Као и приликом одређивања FWHM-а, велике варијабилности добијених вредности и стандардне девијације унутар појединачних група, најизраженије за дифузне астроцитоме чине поуздану диференцијацију различитих градуса неизводљивом (слика 39).

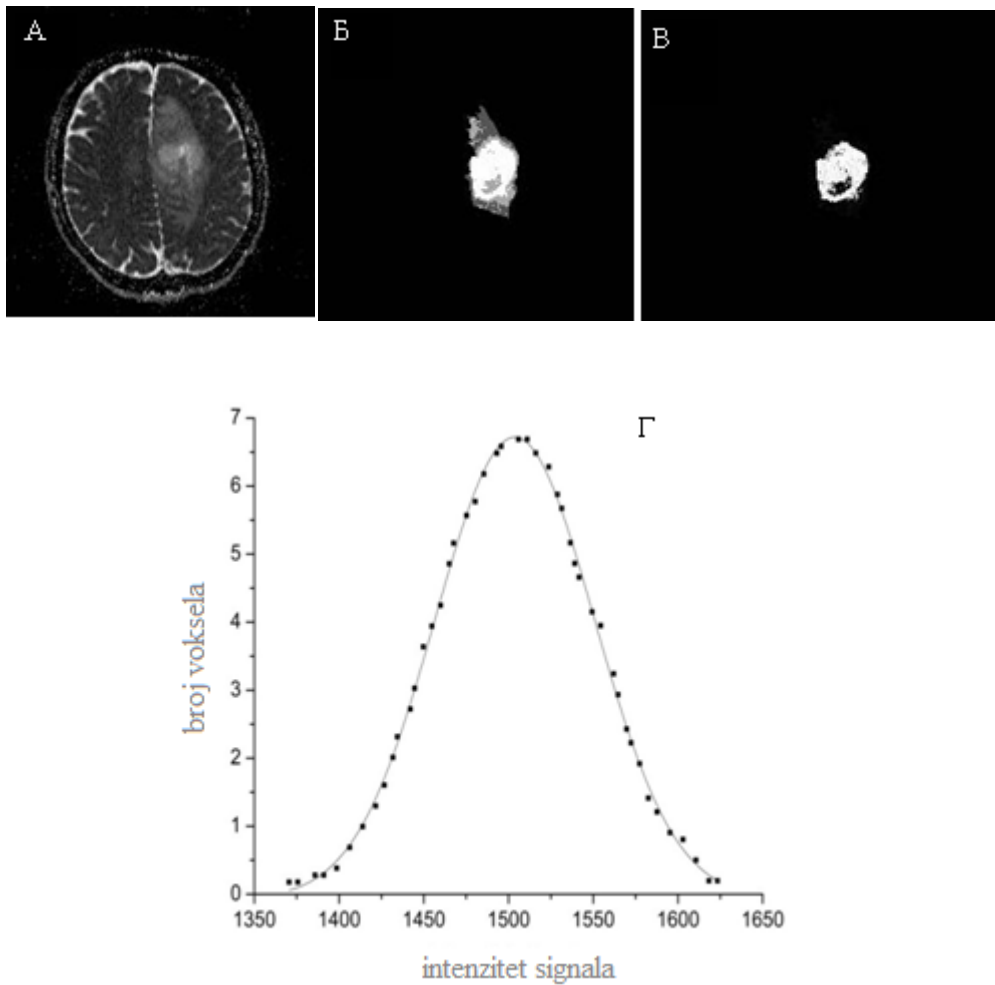


Слика 39 Висина пика добијена за различите групе астроцитних тумора у другом кластеру.

5.1.4 Вредности ADC, FWHM и висина пика хистограмаза различите различите градусе тумора у кластеру 3

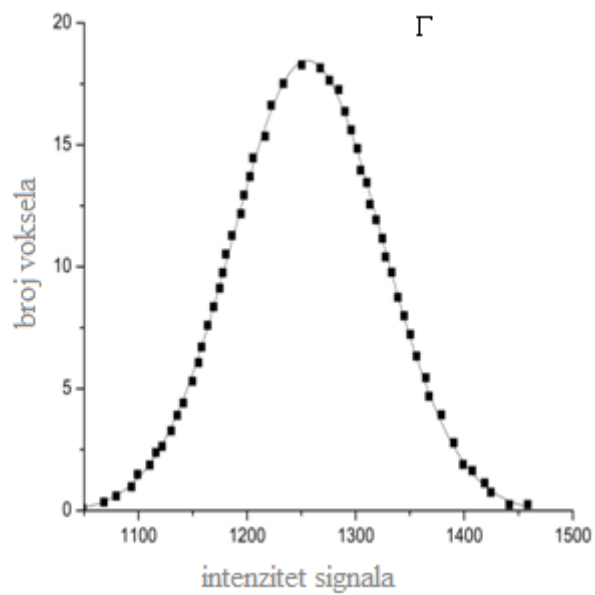
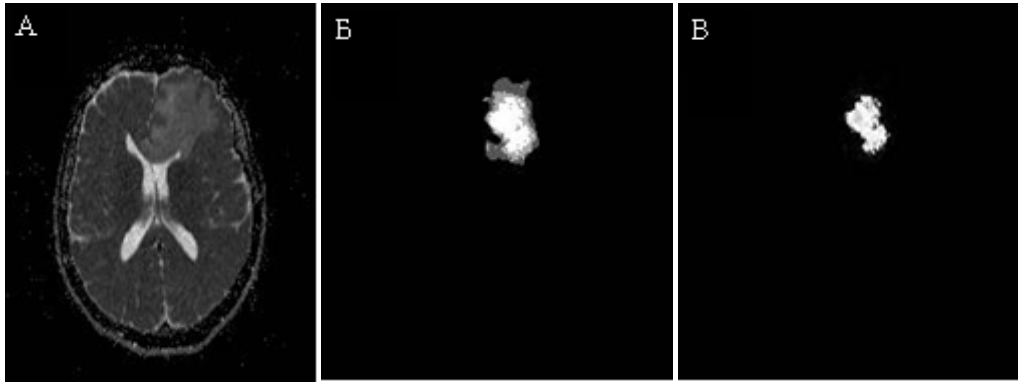
ADC мапе и сегментовани тумор у трећем кластеру након примене техника кластеризације су приказани на сликама 40, 41, 42. За разлику од ДА и АА где хистограми и даље задржавају нормалну расподелу, код ГБМ се уочава померање хистограма ка вишим вредностима. У овом кластеру који по својим карактеристикама одговара едему код ДА код ГБМ осликава његову хетерогену структуру и чињеницу да се у овом кластеру налазе компоненте које би могле одговарати зонама едема са и даље присутним малигним ћелијама.

Дифузни астроцитом



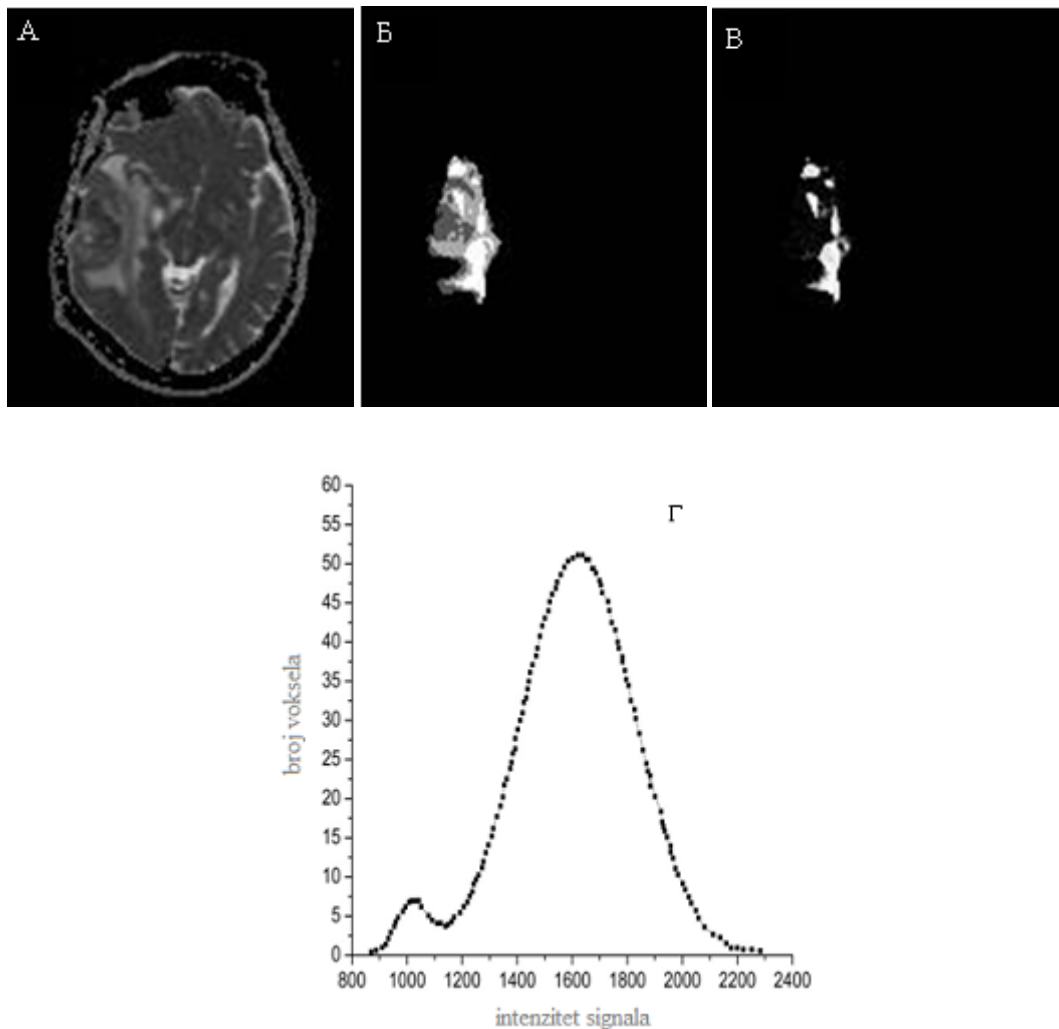
Слика 40 ADC мапа дифузног астроцитома (А), тумор након сегментације FCM техником (Б), као и део тумора који је издвојен као први кластер (В). На слици Г је приказан добијени хистограми који одговара анализи компоненти тумора у трећем кластеру.

Анапластични астроцитом



Слика 41 ADC мапа анапластичног астроцитома (А), тумор након сегментације FCM техником (Б), као и део тумора који је издвојен као први кластер (В). На слици Г је приказан добијени хистограми који одговара анализи компоненте тумора издвојене у трећем кластеру.

Глиобластом мултиформе



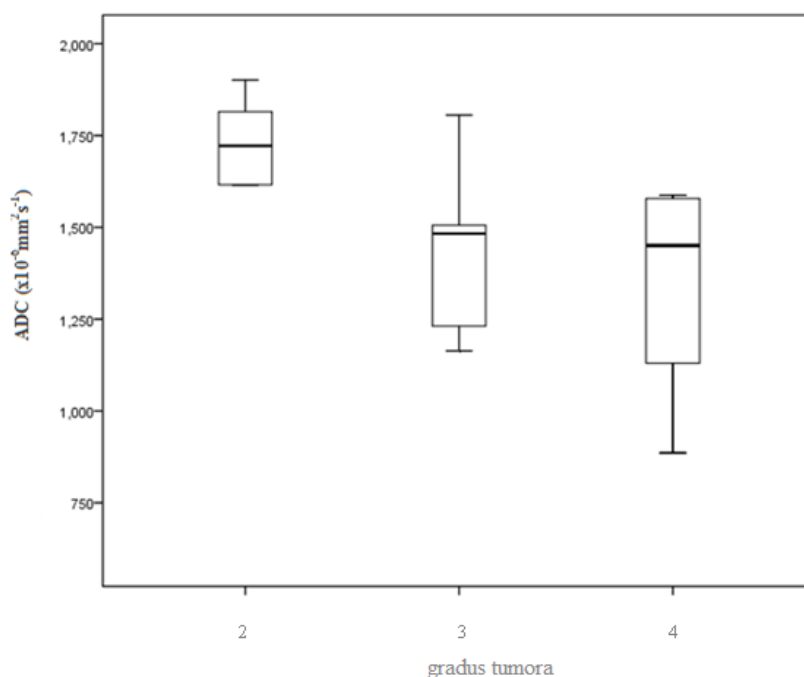
Слика 42 ADC мапа глиобластома мултиформе (А), тумор након сегментације FCM техником (Б), као и део тумора који је издвојен као први кластер (В). На слици Г је приказан добијени хистограми који одговара анализи компоненте тумора издвојене у трећем кластеру.

ADC

Добијене ADC вредности за астроцитом градуса 2, 3 и 4 у кластеру 3 су $1617.1 \pm 17.22 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$, $1386.1 \pm 23.42 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$, $1369.1 \pm 13.52 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ редом. На основу добијених вредности се са статистичком значајношћу могу разликовати само нискоградусни од високоградусних тумора (слика 43).

За ГБМ и у овом кластеру су добијене нешто ниже вредности *ADC*-а. Вредности добијене у кластеру 3 по својим вредностима одговарају зонама едема, а варијације вредности које се запажају у низу од 2 до 4 градуса осликавају повећање хетерогености у низу и чињеници да се код ГБМ малигне ћелије налазе удаљене од примарног места настанка тумора, у зони која по својим морфолошким карактеристикама одговара едему.

Међутим, за АА вредности *ADC*-а не одступају много од претходно добијених, што се објашњава његовом хомогеношћу и указује на немогућност примене техника сегментације на овакве туморе. Такође, то су тумори који на морфолошким МР сликама не показују значајно присуство едема.

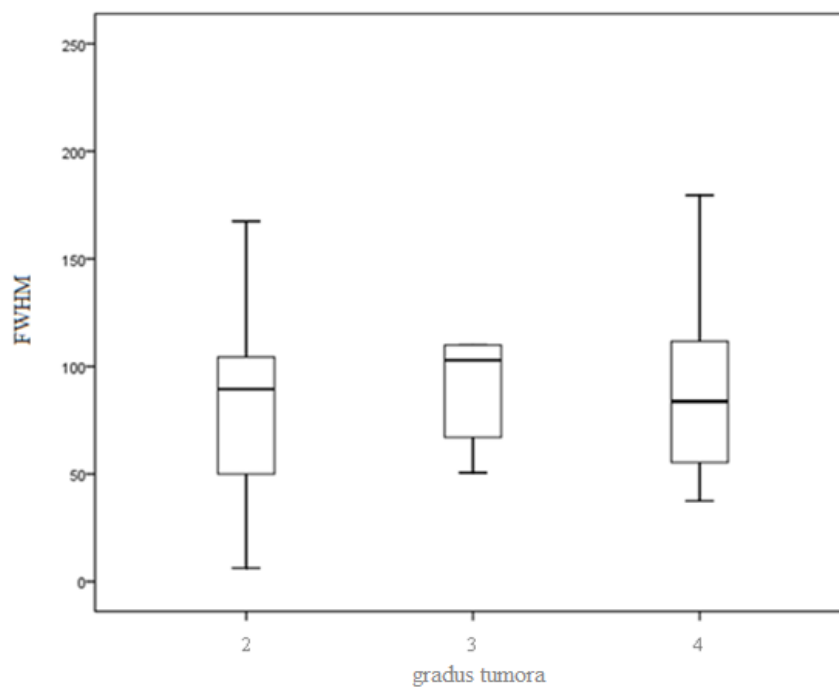


Слика 43 *ADC* вредности различитих типова астроцитоме у кластеру 3.

FWHM

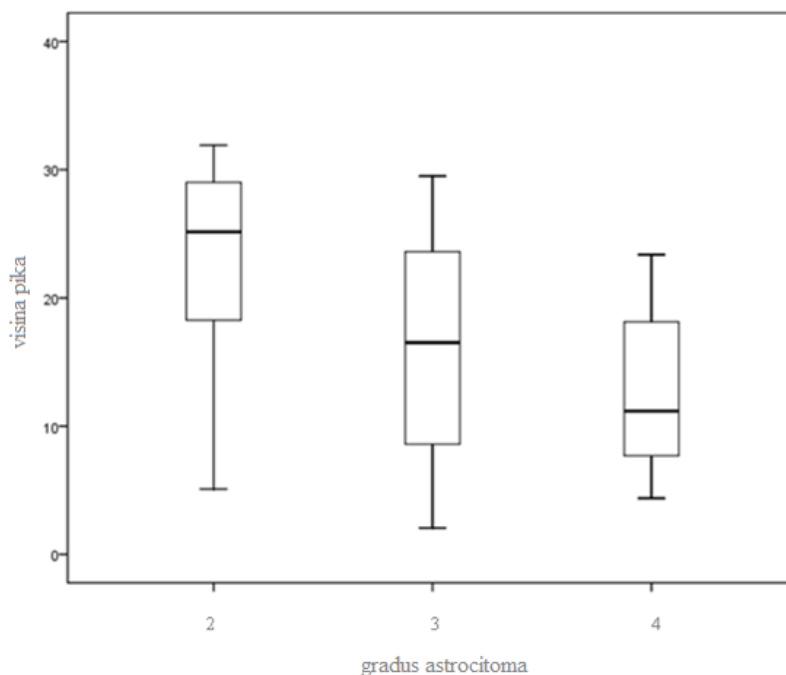
FWHM добијене у трећем кластеру за астроцитоме градуса 2, 3 и 4 износе $105.491 \pm 74.09 \text{ mm}^2/\text{s}$, $112.95 \pm 60.92 \text{ mm}^2/\text{s}$, $115.43 \pm 53.49 \text{ mm}^2/\text{s}$, редом. На основу

добијених вредности се не могу разликовати различити хистолошки градуси тумора.



Слика 44 *FWHM* различитих градуса астроцитних тумора у кластеру 3.

Вредности за *FWHM* су нешто веће у односе на вредности добијене у кластерима 1 и 2. Уколико се узме у обзир да су у овом кластеру добијене вредности које потичу претежно од перифокалног едема очекивано је ширење линије, услед повећаног динамичног опсега и последично смањења висине пика која у овом кластеру износи 27.73 ± 9.24 , 15.25 ± 7.12 , 18.48 ± 13.67 .



Слика 45 Висина пика астроцитних тумора добијена у кластеру 3.

5.1.5 Добијене вредности ADC, FWHM, висине пика хистограма за ГБМ у кластеру 4

Добијена средња вредност за ADC у овом кластеру који је урађен само за ГБМ је $1917.6 \pm 13.22 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$. FWHM у овом кластеру износи $93.51 \pm 25.78 \text{ mm}^2/\text{s}$, а висина пика 11.63 ± 4.98 . Уколико се упореде добијени резултати са резултатима добијеним у кластерима 1, 2 и 3 може се приметити да ADC показује више вредности, док је FWHM и висина пика мања него у претходним кластерима. Ове вредности су сличне вредностима добијеним у трећем кластеру ДА што би значило да тек у овом кластеру су добијене вредности које одговарају перифокалном едему.

У Табели 4 су приказане вредности ADC-а добијене у различитим кластерима.

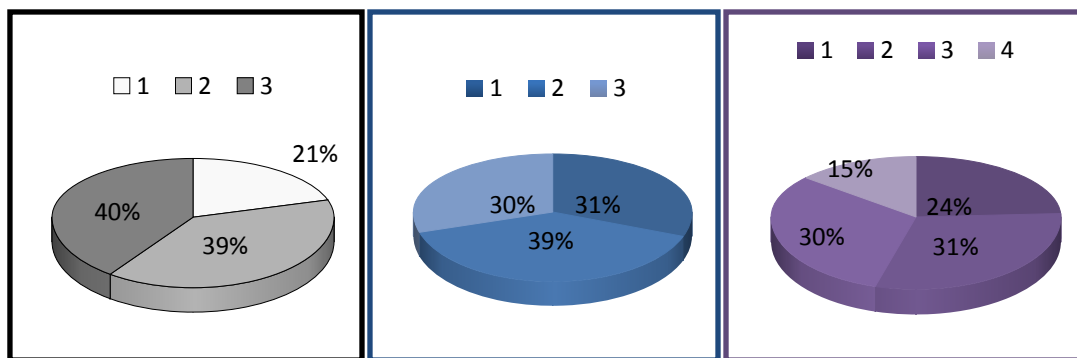
Табела 4 Минималне, максималне и средње вредности ADC-а добијене кластерском анализом различитих градуса астроцитома.

Кластер 1			
ADC±SD(10 ⁻⁶ mm ² /s)	ДА	АА	ГБМ
минимална	1103±123	805±123	701±156
средња	1186±217	1009±199	814±126
максимална	1310±172	1100±124	890±112
Кластер 2			
минимална	1293±25	1153±15	1005±36
средња	1318±16	1162±22	1082±23
максимална	1464±29	1236±12	1169±20
Кластер 3			
минимална	1573±15	1237±15	1113±23
средња	1617±18	1386±23	1369±14
максимална	1792±19	1498±25	1522±19
Кластер 4			
минимална	-	-	1678±29
средња	-	-	1918±31
максимална	-	-	2025±50

ДА - дифузни астроцитом, АА - анапластични астроцитом, ГБМ - глиобластом мултиформе

5.1.6 Удели различитих компонената у односу на читаву запремину тумора

Према уделима компонената у читавој запремини тумора може се приметити да код ДА и ГБМ само 21%, 24%, редом припада солидном делу тумора као компоненте која одговара првом кластеру. Код ДА највећи део запремине припада компоненти из трећег кластера која је дефинисана као едем, 40%, док остали део тумора одговара компоненти из другог кластера која има мешаних карактеристика едема и туморских ћелија (слика 46).



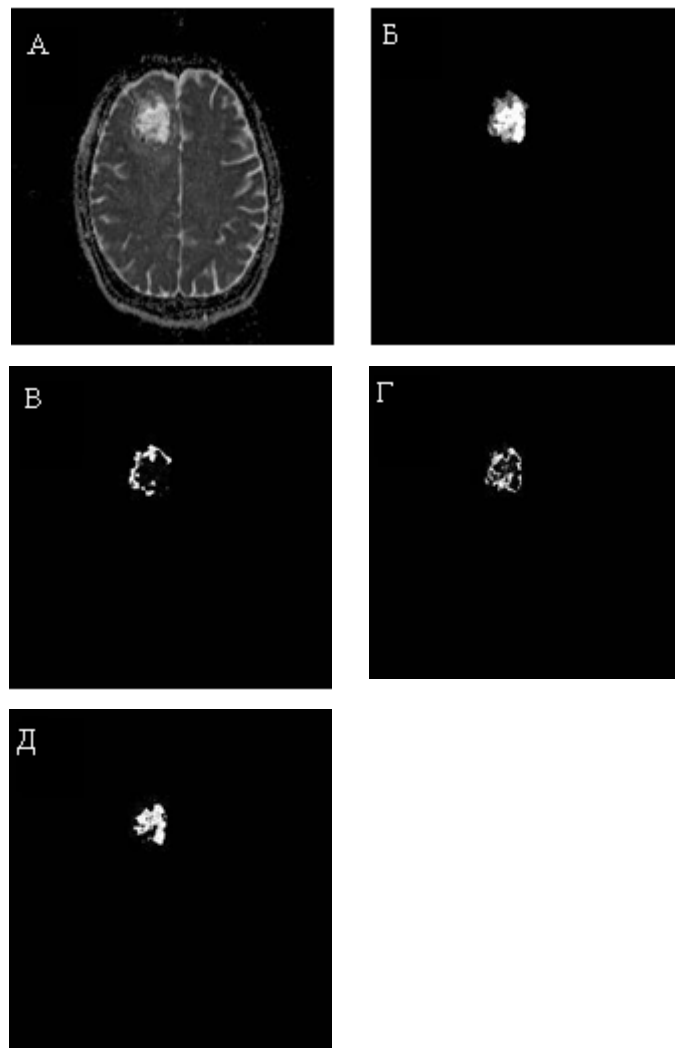
Слика 46 Графички приказ удела компонената код ДА, АА и ГБМ, редом.

Код ГБМ највећи део у односу на читаву запремину тумора припада компонентама другог и трећег кластера у којима имамо мешани утицај туморских ћелија, микронекрозе, микрохеморагије, али и едема. Једино код АА према овим вредностима може се приметити да су удели различитих компонената скоро исти. Оваква расподела удела различитих компонената у односу на читаву запремину тумора осликава њихове хистопатолошке карактеристике.

5.1.7 Вредности ADC, FWHM и висине пика хистограма за прогресију дифузног у анапластични астроцитом

Код претходних група астроцитома сегментацијом су добијене анатомске структуре тумора, било да се ради о туморским ћелијама, едему, цистично/некротичним (слика 47), што је потврђено хистограмском анализом.

Хистограми овако издвојених структура имају нормалну расподелу и по један пик. Међутим, у случају када долази до прогресије налаза из дифузног у анапластични астроцитом, добијени су мултипли хистограми у сва три дефинисана кластера.



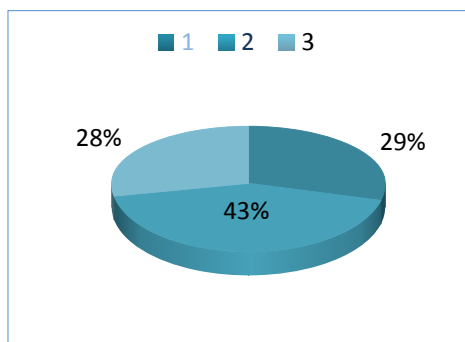
Слика 47 ADC код пацијента са прогресијом налаза из ДА у АА (А), тумор након сегментације FCM техником (Б), као и делови који припадају првом (В), другом (Г) и трећем (Д) кластеру.

Добијени ADC показује вредности које могу одговарати и дифузном и анапластичном астроцитому, према претходно добијеним резултатима. У прва два кластера вредности ADC-а се крећу у опсегу од $900-1300 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$. Тек у

трећем кластеру се издвајају вредности које одговарају компоненти која према претходно анализираним одговара едему.

FWHM код ове групе пацијената има значајно више вредности у односу на појединачну анализу ДА и АА и креће се у опсегу од 100-160 mm²/s. Висина пика је нижа са просечном вредношћу 7.

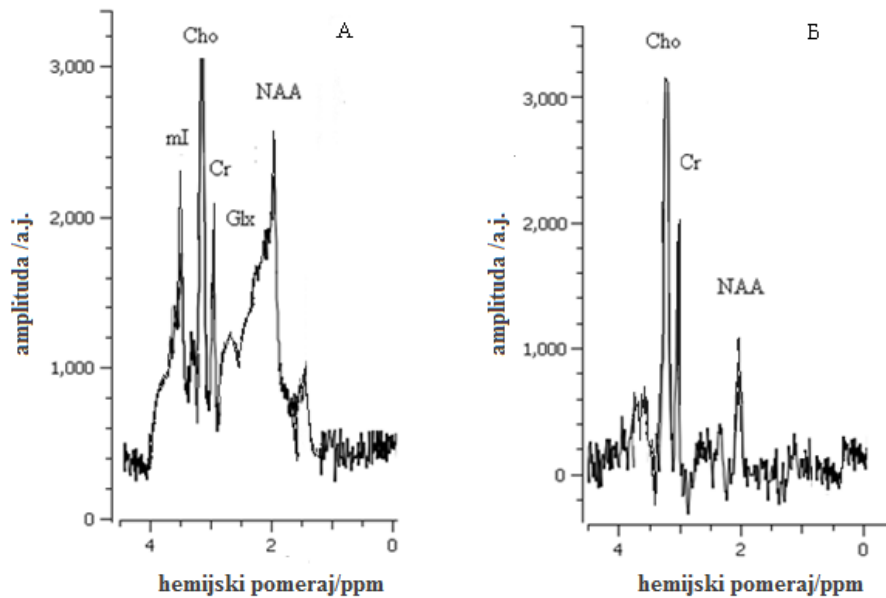
Анализом удела компонената тумора у његовој читавој запремини показује да је удео компоненте из кластера 1, који би требало да садржи само туморске ћелије, већи у односу на читаву запремину тумора, 43% (слика 48). Према приказаном резултату у поређењу са ДА код којих се запажа мањи удео компоненте из првог кластера само 21%, могло би се претпоставити да се ради о хомогенијем тумору што иде у прилог АА, пре него ДА.



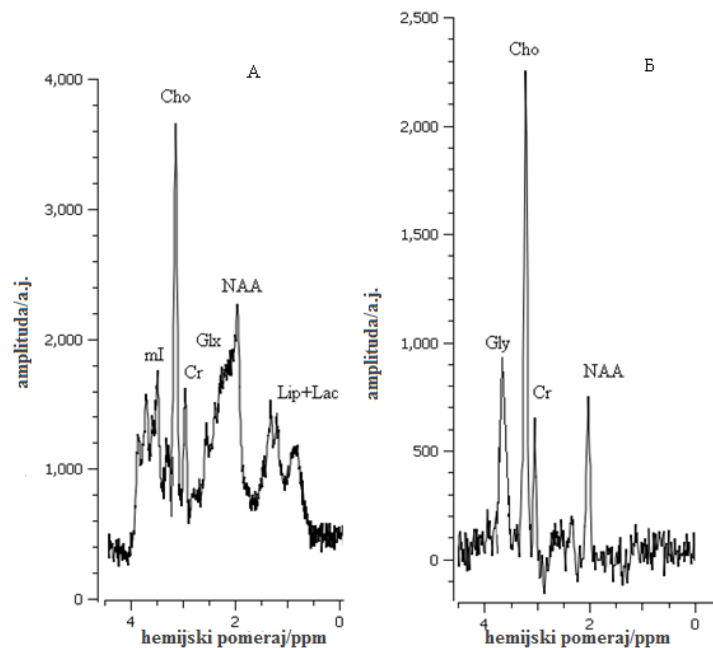
Слика 48 Графички приказ удела компонената код прелаза дифузног у анапластични тумор.

5.2 Магнетно-резонантна спектроскопија

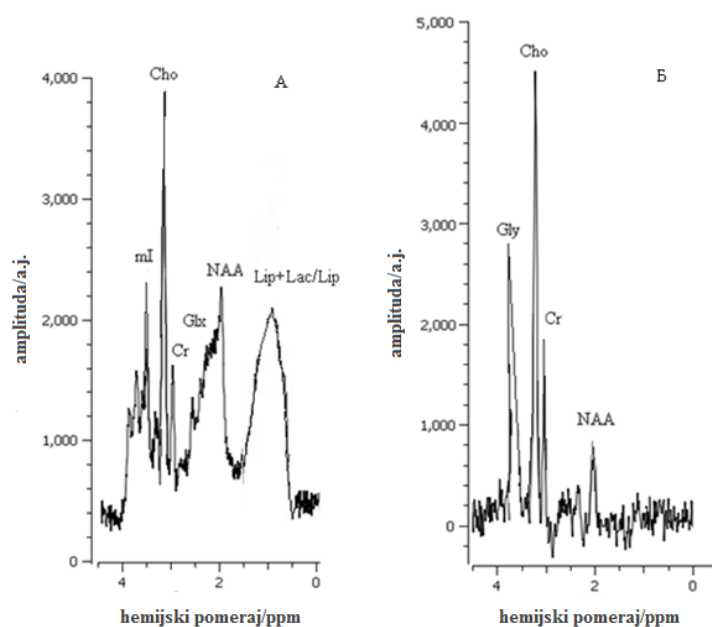
Репрезентативни МР спектри астроцитних тумора са кратким ($TE=30\text{ ms}$) и средњим ($TE=135\text{ ms}$) временом еха приказани су на сликама 49, 50 и 51.



Слика 49 Протонски МР спектри добијени за дифузни астроцитом са временом еха 30 ms (А) и 135 ms (Б).



Слика 50 Протонски МР спектри добијени за анапластични астроцитом са временом еха 30 ms (А) и 135 ms (Б).



Слика 51 Протонски МР спектри добијени за глиобластом мултиформе са временом еха 30 ms (А) и 135 ms (Б).

Линеарна дискриминантна анализа је примењена у циљу добијања метаболита/комбинације метаболита, добијених МР спектроскопијом у класификацији астроцитних тумора.

Резонанције од интереса у спектру које су укључене у анализу су: *mI/Gly* ([3.450,3.680] ppm), *Cho* ([3.115,3.265] ppm), *Glx* ([2.270,2.510] ppm), *NAA* ([1.935,2.085] ppm), *Lac* ([1.235,1.385] ppm), *Lip* ([1.125,1.275] ppm).

На основу Kruskal-Wallis-овог теста утврђено је да на спектрима са TE=30 ms две резонанције показују статистичку значајност ($p < 0.001$) према њиховим концентрацијама код астроцитних тумора и то: *mI*, *Glx*.

На спектрима са TE=135 ms према резултатима Kruskal-Wallis теста су добијене три резонанције које имају статистички значај ($p < 0.001$), у разликовању група астроцитома; *Gly* и *Lip* и *Lac* чије је изражено присуство запажено код високоградусних тумора.

Резултати добијени за испитиване метаболите, mI, Glx и Gly, су приказане у табели 5.

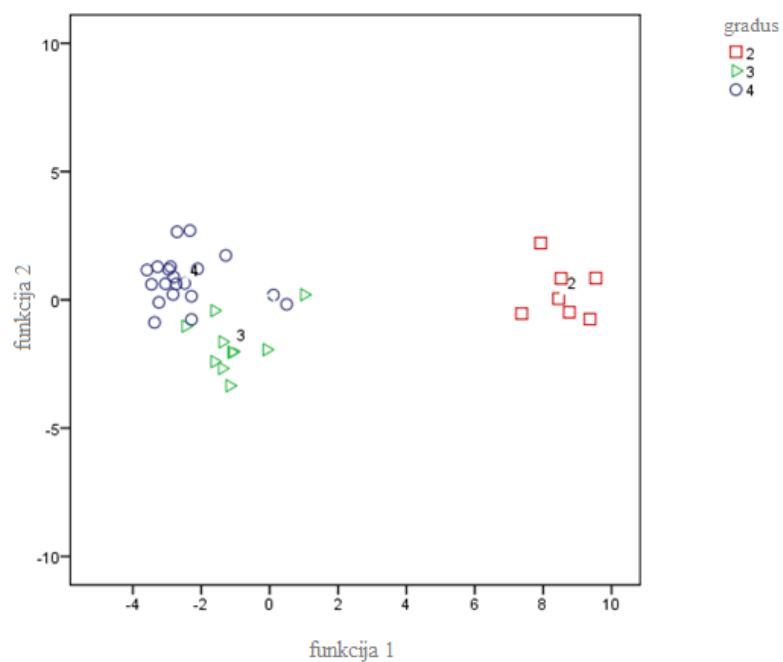
Табела 5 Добијене вредности концентрације mI, Glx и Gly применом кратких (TE=30 ms) и средњих времена еха (TE=135 ms)

унутар солидног дела тумора			
	mI	Glx	Gly
TE=30 ms			
ДА	3.94	1.62	-
АА	2.29	2.55	-
ГБМ	2.20	2.9	-
TE=135 ms			
ДА	-	-	1.31
АА	-	-	1.84
ГБМ	-	-	2.29

ДА-дифузни астроцитом, АА-анапластични астроцитом, ГБМ-глиобластом мултиформе, mI-миоинозитол, Glx-глутамат+глутамин, Gly-глицин

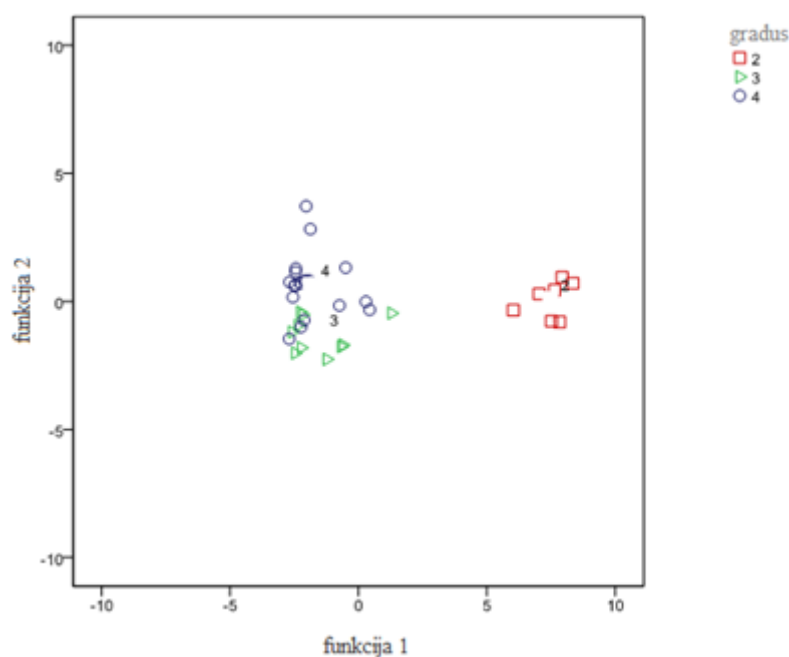
Повишене вредности mI, као и снижене вредности Glx и Gly су добијене код ДА, док код АА и ГБМ уочава се повишена концентрација Glx и Gly у односу на ДА. Gly пик није детектован код свих ГБМ пацијената, али код пацијената код којих је био присутан пик Gly углавном се јављао само у солидним деловима тумора. Добијен однос mI/Cr код ДА је износио 2, док је тај однос код АА и ГБМ, 0.39 и 0.027, редом.

Успешност класификације од 94.6% је добијена када се као улазни параметри у ЛДА укључе Glx, Gly и mI (слика 52).



Слика 52 ЛДА анализа у случају када се *Glx*, *Gly* и *mI* одаберу као улазни параметри

На овај начин је тачно класификовано 7 од 7 ДА (100%), 9 од 10 АА (90%) и 18 од 20 (90%) ГБМ.



Слика 53 ЛДА анализа у случају када се као улазни параметри одаберу глутамат/глутамин и миоинозитол.

Уколико се у класификацију укључе само два параметра *Glx* и *mI* успешност класификације се смањује на 83.8% (слика 53) и то 7 од 7 ДА (100%), 9 од 10 АА (90%) и 15 од 5 (75%) ГБМ. Ова комбинацијом метаболита са тачношћу од 100 % класификује само ДА.

Када се анализирају појединачни метаболити за *Glx* се добија највећа тачност класификације, 89.2%. На основу његових вредности тачно се класификује 7 од 7 (100%) ДА, 8 од 10 (80%) АА и 18 од 20 (90%) ГБМ.

Класификација само на основу резонанција *Gly* је дала успешност од 78.4%. Тачно је класификовано 7 од 7 (100%) ДА, 8 од 10 (80%) АА и 14 од 20 (70%) ГБМ.

Према вредностима *mI* тачност класификације је само 73%. И на основу овог метаболита се само са тачношћу од 100% класификује ДА. АА је класификован тачно у 6 од 10 (60%), а ГБМ 16 од 20 (80%).

На МР спектрима са кратким и средњим временом еха односи метаболита, NAA/Cr, Cho/Cr, Cho/NAA за вокселе који су изабрану унутар тумора и контралатерално су приказане у Табели 6. За изабране вокселе контралатерално приказани је однос Cho/Cr.

Табела 6 Добијене вредности односа метаболита унутар тумора и контралатерално у нормалном, здравом ткиву са кратким ($TE=30\text{ ms}$) и средњим ($TE=135\text{ ms}$) временом еха.

	унутар тумора		контралатерално	
	NAA/Cr	Cho/Cr	Cho/NAA	Cho/Cr
TE=30 ms				
ДА	1.01	1.52	1.62	0.81
АА	0.52	1.93	1.40	0.83
ГБМ	0.48	2.99	1.33	0.96
TE=135 ms				
ДА	1.13	1.49	1.68	1.13
АА	0.76	1.88	1.99	1.24
ГБМ	0.61	2.89	2.15	1.34

ДА-дифузни астроцитом, АА-анапластични астроцитом, ГБМ-глиобластом мултиформе, NAA-Н-ацетилапаратат, Cho-холин, Cr-креатин

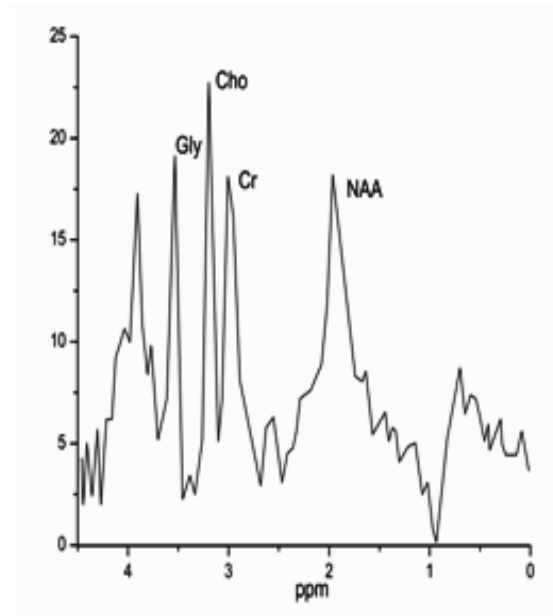
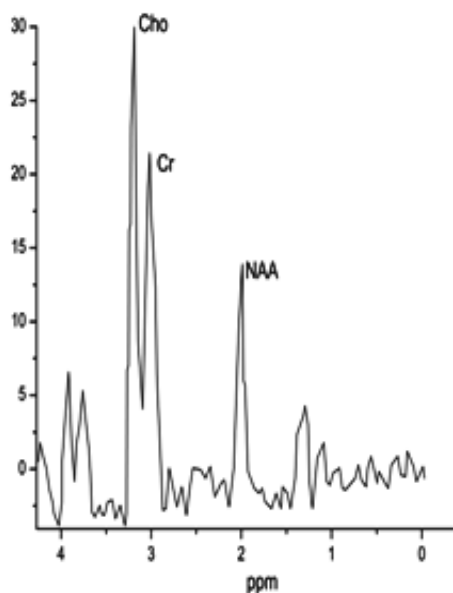
За дифузне астроцитоме су добијене вредности Cho/Cr које су вариране од 1.2 (5/19 (25%)) до 1.9 (15/19 (75%)), али је однос увек повишен у односу на контралатерално здраво ткиво. Код високоградусних тумора, АА и ГБМ, ове вредности су знатно више и крећу се у опсегу од 1.5 - 10.

Снижене вредности NAA/Cr су добијене код свих астроцитних тумора, без обзира да ли је МР спектроскопија рађена на кратким или средњим временима еха. NAA је значајно редукован код свих пацијената, мада су нешто мање вредности односа NAA/Cr израженије на спектрима са кратким временом еха услед појаве већег броја метаболита који услед преклапања резонанција знатно отежавају интерпретацију добијеног спектра.

Код високоградусних тумора за разлику од нискоградусних се јављају и резонантне линије Lip+Lac и Lip пикова, у зависности од примењеног времена еха. Наведени метаболички односи код ДА, АА и ГБМ су показали значајне разлике у односу на односе који су добијени у нормалном, здравом ткиву.

МР спектри добијени код пацијената са дијагностикованом прогресијом налаза указују на присуство Lip+Lac и Lip резонанција на спектрима са кратким временом еха. У случају МР спектра добијених са средњим временом еха код 4/7 пацијената је применђено присуство Gly пика, што према раније наведеном одговара спектрима који су добијени код високоградусних тумора.

За разликовање псеудопрогресије од прогресије код ГБМ анализа спектра са средњим временом еха је указала на снижене вредности односа NAA/Cr, као и значајно повећање односа Cho/Cr у односу на вредности овог односа у контралатералној белој маси (слика 54). Овакав налаз је запажен у обе групе. Међутим, пик Gly се може детектовати само у групи рекурентних ГБМ и то код 20% анализираних спектра, док присуство овог метаболита није забележено у групи псеудопрогресије. Однос Gly/Cr је 0.50 до 0.95, а Gly/Cho је у опсегу од 0.12 до 0.18.



Слика 54 МР спектри псевдопрогресије (А) и прогресије (Б) ГБМ добијени CSI PRESS локализационом техником на 135 ms. Пик глицина је видљив само на спектрима рекуретних тумора (Б).

5.3 Субдиференцијација подтипова глиобластома

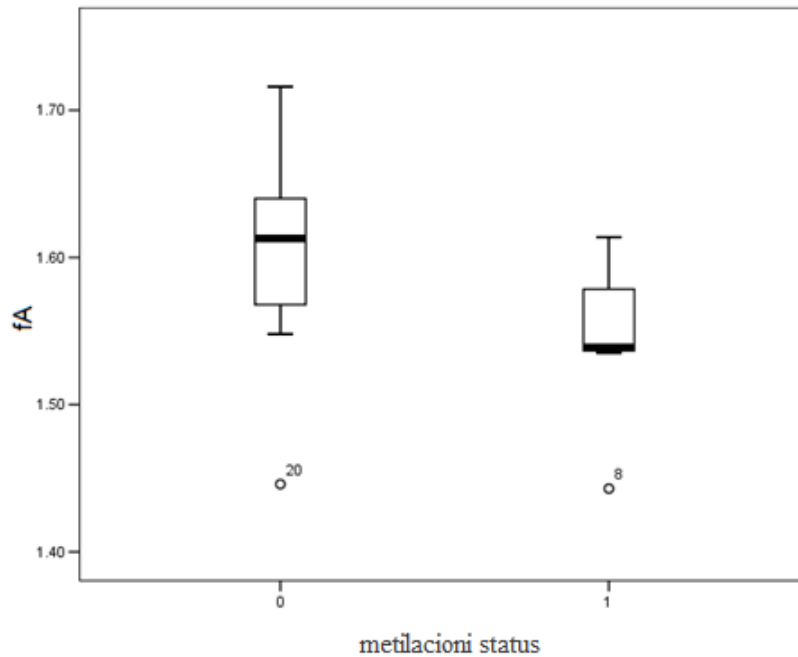
5.3.1 Фрактална анализа

Добијени параметри фракталне анализе приказани су у табели 7.

Табела 7 Параметри добијени фракталном анализом за метилисане и неметилисане ГБМ где су: Су-циркуларни параметар, f_C -фрактална димензија ван контуре тумора, f_A -фрактална димензија површине постконтрастног појачања, а rNE однос некрозе и површине са појачањем сигнала након примене парамагнетног контрастног средства.

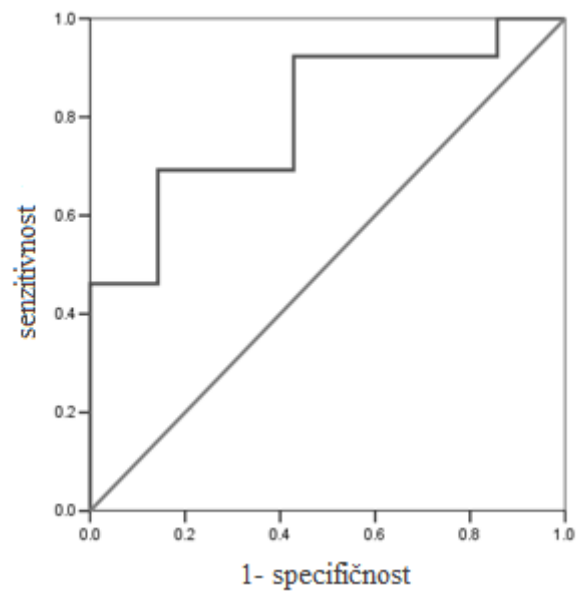
параметар	метилисани	неметилисани
СУ	0.68±0.12	0.64±0.12
f_C	1.37±0.06	1.35±0.09
f_A^*	1.55±0.55	1.61±0.07
rNE	0.84±0.08	12±4.9

Статистички значајна разлика се уочава за вредности fA неметилисаних ГБМ у односу на вредности добијене за метилисане ГБМ (слика 55).



Слика 55 Фрактална димензија fA за метилисане и неметилисане ГБМ.

Према вредностима овог параметра се могу разликовати подтипови ГБМ са сензитивношћу од 68% и специфичношћу од 86% (слика 56). Није нађена статистички значајна разлика у вредностима параметара fC , rNE и Su подтипова ГБМ. Међутим, може се приметити да код метилисаних ГБМ знатно је сужен опсег вредности rNE (стандардна девијација <10 %) у односу на неметилисане.



Слика 56 ROC криве за fA метилисаних и неметилисаних ГБМ.

6. Дискусија

Примена техника дифузијски наглашеног снимања и магнетно-резонантне спектроскопије показале су могућност евалуације микроструктурних и физиолошких карактеристика тумора централног нервног система као и неинвазивно добијање информација компатибилних са хистопатолошким налазом.

Успешност класификације можданих тумора на основу класичне анализе дифузијског МРИ у разликовању тумора у великој мери зависи од искуства оператера, што се највише запажа приликом дефинисања региона од интереса [13-15,50,51]. Обзиром на повезаност ниског ADC-а са високим степеном целуларности тумора прецизно дефинисање региона од интереса на коме ће се извршити мерење ADC вредности је изузетно значајно [51,53].

На дифузијским МР сликама често се могу уочити нехомогености у сигналу које се јављају као последица појаве неизбежних артефаката неједначености РФ поља током аквизиције, али и других фактора [119-124,125]. Они доводе до тога да пиксели/воксели појединих ткива у великој мери варирају по интензитету сигнала због чега је њихова интерпретација знатно отежана.

Johnson et al [126], *Lim et al.* [127] и *Brickmann et al* [121] су међу првима применили технику сегментације и применили хомоморфне филтере у покушају да елиминишу утицај наведених артефаката. Међутим, *Brickmann* [121] је показао да применом хомоморфних филтера долази пре до израженије дисторзије слике него до корекције интензитета сигнала. У својој студији *Meyer* [122] је методом детекције ивица вршио дефинисање граница тумора, као и његову сегментацију. Метода се заснивала на дефинисању контуре тумора помоћу дисконтинуитета нивоа сиве скале на сликама. Међутим, такав приступ је доводио до повећања нивоа шума и неједнозначности мерења, те могућности да се исти интензитет појављује у различитим сегментима. *Lee u Warner* [124] су корекцију T_1W слика

вршили помоћу *FCM* алгоритма, с тим да су слике сегментоване у само два кластера. Основна примена оваквог начина сегментације слике је да се према интензитетима добијених сигнала уклони позадина из испитиваног сегмента.

Даљи напредак у примени техника сегментације у анализи МР слика донела је примена Марковљевог модела [128,129]. Наиме, у алгоритам је уврштена и просторна интеракција пиксела, што је довело до значајног редуковања утицаја шума и грешке услед преклапања кластера. Мана ове технике је веома сложен избор параметара који утичу на просторну интеракцију, што може утицати на приказ анатомских детаља испитиваних можданих структура, самим тим и губитка информација.

Предност сегментације применом *FCM* алгоритма је што се елиминише потреба за експлицитним моделирањем класа као у другим техникама [125,129]. Такође, овом методом се може вршити сегментација неколико ткива истовремено, што представља предност у односу на технике код којих се мора дефинисати ткиво која се жели сегментовати.

Радови на унапређивању постојећег *FCM* алгоритма за примену сегментације МР слика базирају се на укључивању просторне корелације међу пикселима. *Liew* [130] предлаже „fuzzy“ алгоритам који садржи информације о локалном просторном налажењу пиксела. *Kang et al.* [131] и *Ahmed et al* [132] су независно извршили модификацију алгоритма тако да се при свакој итерацији изнова дефинише појам суседног пиксела. У овом случају итерацијом, вероватноће суседа утичу на централни пиксел чиме се приликом сваке итерације шири регион локалних класификација које утичу на централни пиксел. Иако је сваки од ових алгоритама допринео побољшању методе и даље се јавља проблем времена трајања методе и сложености одређивања параметара што у многоме отежава њихову примену у свакодневном раду.

С тога је рад базиран на примени независне *FCM* технике сегментације без додатне модификације алгоритма. Овакавим приступом могуће је тумор

сегментирати на унапред дефинисани број кластера који би садржали солидни део тумора, зоне некрозе/цисте, хеморагије и перитуморски едем [13,15,16, 127,129]. Пошто је у анализи обухваћен цео тумор утицај субјективности који је присутан приликом ручног одабира региона од интереса је у највећој мери смањен.

Добијене разлике у кластерима одговарају груписаним пикселима са високим/ниским интензитетом сигнала на ADC мапи. При томе требало би истаћи да дефинисани регион од интереса садржи све вокселе на свим пресецима. Тиме је обухваћена читава лезија на свим пресецима што би се могло сматрати 3D анализом исте.

Примењеним FCM алгоритмом се добијени подаци за сваки пиксел повезују са оним кластером у односу на чији центар су најмање удаљене. С тога дефинисање броја кластера заузима важну улогу у примени ове технике. Број кластера се мора унапред дефинисати на основу чега се рачунајући центроиде кластера у сваком кораку прави комбинација све док се не нађе такво решење у коме је варијабилитет унутар кластера најмањи, а варијабилност између кластера што је могуће већа. Приликом дефинисања броја кластера, за разлику од студије *Srinivasan et al.* [17] у којој су, независно од типа тумора, кластери дефинисани према интензитету сигнала на оне са ниским, средњим и високим интензитетом сигнала, у овој дисертацији узета је у обзир хетерогеност тумора. Према томе, број кластера за дифузне и анапластичне астроцитоме је 3 док је за глиобластом дефинисано 4 кластера. Оваква подела донекле одговара и природној подели анатомских структура ових тумора [53,58,133-135]. Иако је познато да су анапластични астроцитоми најхомогенији од свих астроцитних тумора, изабран је број кластера 3 како би се могла извршити упоредна анализа са групом пацијената код којих је дошло до прогресије налаза из дифузног у анапластични.

На овај начин, након сегментације могло би се очекивати да су према интензитету сигнала у првом кластеру издвојене зоне које одговарају солидном

делу тумора, док би, према томе у трећем кластеру били добијени интензитети сигнала који се сматрају зоном перитуморског едема.

Анализа хистограма

Анализом хистограма добијених за први кластер запажено је континуирано смањење ADC вредности са порастом градуса астроцитоза, при чему је највећа разлика добијена између хистолошких градуса 2 и 4. То се може објаснити разликом у целуларности између ова два типа тумора. Разлика би била изразитија да не долази до појаве васкуларизације код градуса 4 самим тим и удела брже компоненте дифузије.

У више студија [6,8,9,54,68,136-139] нађено је да минимални ADC од $900 \cdot 10^{-6} \text{mm}^2/\text{s}$ представља вредност прага која омогућава високу осетљивост и специфичност раздвајања нискоградусних од високоградусних астроцитних тумора. Слични резултати се могу наћи и код *Yang et al.* [6] где је као репрезентативна узета најнижа измерена вредност привидног дифузионог коефицијента од $449 \cdot 10^{-6} \text{mm}^2/\text{s}$ измерена у глиобласту, $691 \cdot 10^{-6} \text{mm}^2/\text{s}$ у анапластичном астроцитозу, а $1083 \cdot 10^{-6} \text{mm}^2/\text{s}$ у дифузног астроцитозу. Међутим, према опсегу средње ADC вредности од $1008-1330 \cdot 10^{-6} \text{mm}^2/\text{s}$ нису се могле међусобно разликовати групе астроцитоза. Пораст у ADC вредности код ове врсте тумора је очекиван пре свега због његове инфилтративне природе и чињенице да се у запремини од интереса налази здраво ткиво, али и зоне микронекрозе и микрокрварења због чега и добијене вредности ADC-а астроцитоза варирају међу студијама.

Добијени хистограми за компоненту у првом кластеру код свих група астроцитоза имали су нормалну расподелу, без појаве других пикова који би својим присуством указивали на мешање компонента других кластера. До сличног закључка су дошли и *Tanaka et al.* [140] евалуацијом хистограма добијених код реналних карцинома. Наиме, за РОИ који је дефинисан у солидном делу лезије добијен је само један пик, док у хистограму који је добијен из РОИ-ја

целог тумора, добијено је више пикова. *Tozzer et al.* [72] указују на разлику у *ADC* хистограмима у смислу померања хистограма ка нижим или вишим вредностима, нискоградусних астроцитома и олигодендроглиома. Разлика у хистограмима је објашњена на темељу биолошких карактеристикама ове две врсте тумора. Међутим, како су у испитивање укључени само нискоградусни тумори различитог порекла долазило је до преклапања вредности добијених параметара међу испитиваним групама.

Анализом добијених, појединачних сегмената астроцитних тумора градуса 2, 3 и 4 су добијене средње вредности привидног дифузионог коефицијента које су нешто ниже у односу на вредности у студијама *Yang et al.* [6] и *Higano et al.* [136]. Према овако добијеним вредностима са високом специфичношћу и сензитивношћу је било могуће разликовати градусе астроцитних тумора. Постојање статистички значајне разлике између АА и ГБМ се не може приписати разлици у целуларности, јер је познато да ове две врсте астроцитних тумора имају сличну ћелијску густину. Објашњење би најпре требало потражити у хистолошким карактеристикама ова два типа тумора [53,133,134,141,142]. Ткиво глиобластома се састоји од слабо диференцираних плеоморфних астроцитних ћелија и фокуса некрозе које су окружене малим перпендикуларно постављеним, фузиформним глијалним ћелијама (псеудопалисадни тип) због чега је и сврстан међу најхетерогеније туморе [23,24,25]. За разлику од ГБМ код АА нису регистроване зоне микронекрозе/некрозе и микрокрварења. Поред тога глиобластоми могу садржати и олигодендроглијалну компоненту што додатно може утицати на вредности *ADC*-а. Те вредности могу бити широког опсега што највероватније карактерише наведену хистолошку разлику, где су делови тумора који су на МР снимцима оцењени као солидни помешани са подручјима интерстицијског едема и микроскопске некрозе или олигодендроглијалне компоненте.

Приказани резултати такође потврђују наведено да *ADC* вредности зависе не само од густине ћелија већ и од присуства микроскопских зона некрозе и хеморагије, али и састава ванћелијског простора [9,53,56,136,137]. Неуједначен

састав екстраћелијског матрикса, који је нарочито изражен код ГБМ манифестује се променом и нивоима хидрофилних гликозаминогликана и хијалуронана [143] што доводи до промене вискозности ванћелијског протора. Међутим, тешко је одвојити утицај густине ћелија од утицаја вискозности на дифузију, с обзиром да већа густина ћелија повлачи и редуковану запремину ванћелијског простора. Осим тога на ADC могу утицати и густина капиларне мреже, микрокалцификације и микрокрварења, све у смислу привидног или стварног смањења ADC-а. Тако не-неопластичне ћелије попут фибробласта које производе цитокине и протеолитичке молекуле на тај начин подржавајући раст тумора и ремоделирајући ванћелијски матрикс. Осим хијалуронана могућ је и утицај хепаран сулфата и дерматан сулфата, за чији утицај су даља испитивања још увек у току [144,145].

Ширина линије на половини максималне висине пика у првом кластеру које показују приближне исте вредности за астроцитне туморе градуса 2 и 3 које су пак знатно више у односу на градус 4, што није очекивано узевши у обзир повезаност ширине линије добијеног пика са хетерогеношћу; што је тумор хомогенији ширина линије је мања, па се смањује динамички опсег хистограма. Приликом испитивања утицаја b вредности на изглед хистограма [146] показано је да се искључивањем утицаја едема, односно повећавањем b вредности у дифузијском МРИ-ју, сужава линија у хистограму. Могло би се очекивати да ширина линије код AA показује најмање вредности јер су то у низу најхомогенији тумори или бар сличне онима добијеним за ГБМ због сличне ћелијске густине [141,142,146].

Сужавање пика последично доводи до повећања његове висине [136]. Добијене висине пика показују највише вредности за AA док је код ГБМ-а запажена најнижа вредност, али се на основу овог параметра нису могли међусобно разликовати.

Анализа ADC вредности добијених у другом кластеру за анапластичне астроцитоме је сличних као у кластеру 1 одакле проистиче закључак да се код

хомогених тумора услед малих варијација вредности ADC-а унутар групе знатно отежава примена техникама сегментације. Наиме, код оваквих типова тумора пиксели са истим интензитетима сигнала се могу наћи у више кластера, што иде у прилог и добијеним, неочекиваним резултатима FWHM-а у првом кластеру.

Велике вредности стандардне девијације унутар појединачних група чине поуздано раздвајање између различитих градуса астроцитома неизводљивим, али би могле указивати на чињеницу да се у овом кластеру налазе мешане компоненте у којима доминира солидни део тумора. Не изненађује што се у овом кластеру према добијеним вредностима привидног дифузионог коефицијента могу разликовати само високоградусни од нискоградусних тумора. Као и при одређивању ADC-а велике вредности стандардне девијације за FWHM унутар појединачних група, најизраженије за дифузне и анапластичне астроцитоме чиниле су поуздано разликовање неизводљивим. Ни FWHM као ни вредности висине пика нису се значајно разликовале у низу од градуса 2 до 4, што осликава њихову хетерогеност на микроскопском нивоу.

У кластеру 3 за ГБМ су добијене релативно ниске вредности ADC-а, за разлику од АА чије вредности ADC-а не одступају од вредности добијених у прва два кластера. То се може објаснити чињеницом да су ГБМ изузетно хетерогена и инфилтративна група астроцитома чије се туморске ћелије могу наћи и у зони перифокалног едема [8,51,46,47,67]. Сличан налаз би се могао очекивати и код астроцитома градуса 2 због свог дифузног ширења. Међутим, код овог градуса густина ћелија је мања самим тим и рестрикција дифузије није толико изражена, нарочито не у зони перифокалног едема и дубоке беле масе. С тога би високе вредности ADC-а у кластеру 3 код ДА могле одговарати зонама едема. Као што је већ показано за АА технике сегментације нису најбољи избор због хомогености тумора и налажења пиксела са истим и/или сличним интензитетом сигнала унутар различитих кластера. За ДА у овом кластеру добијене вредности су у складу са добијеним вредностима из литературе које одговарају зонама едема [147-150]. Међутим, код ГБМ-а у трећем кластеру су добијени нешто ниже вредности привидног дифузионог коефицијента са карактеристичним померањем

хистограма ка вишим вредностима и појавом нових пикова што упућује на присуство туморских ћелијама у зонама перифокалног едема. Слично су показали *Burger et al.* [151,152]. За ДА и АА дистрибуција хистограма је нормална без присуства других пикова.

Вредности за FWHM су нешто веће у односе на вредности добијене у кластерима 1 и 2. Уколико узмемо у обзир претпоставку да су у овом кластеру добијене вредности које потичу претежно од перифокалног едема неизоставно је ширење линије, услед повећаног динамичког опсега и последично смањења висине пика.

Иако су неуропатолошка испитивања показала присуство туморских ћелија и ван граница перитуморског подручја, проблем у одређивању граница тумора и разликовању од вазогеног едема је у хетерогености високоградусних тумора. С хистолошког гледишта подручја у којима постоји промењен интензитет сигнала ван зона у којима долази до појачања интензитета сигнала након примене парамагнетног контрастног средства представља мешавину вазогеног едема и инфилтративних туморских ћелија [148,149]. Могуће је да постоји доминација туморских ћелија која смањује ADC због чега у овом кластеру имамо појаву додатних пикова и ниже ADC вредности. Обзиром да едем карактерише повећање запремине интерстицијске течности то би омогућило релативно слободну дифузију, док у случају присуства туморских ћелија и у зони перифокалног едема, као што је случај код глиобластома, постоји рестрикција дифузије што се огледа у редукцији привидног дифузионог коефицијента код ових тумора. На ту чинњеницу указује и *Kelly et al* [59] показујући да уска перитуморска зона где се запажа низак привидни дифузиони коефицијент може одговарати цитотоксичном едему и исхемији због компресивног ефекта тумора на околно ткиво, што је потврђено и на животињском моделу [150].

Четврти кластер је дефинисан само код глиобластома због његових патохистолошких карактеристика, што се показало као оправдано, јер у овом кластеру ADC вредности су сличне онима добијеним у трећем кластеру за ДА, а које у поређењу са резултатима из литературе [8,9,46,47,51,53,56,65,67,136,137] се

могу приписати перифокалном едему. Вредности преко $1600 \cdot 10^{-6} \text{mm}^2/\text{s}$ како је већ наведено одговарају зонама едема.

Анализа хистограма код прогресије дифузног у анапластични астроцитом

Сегментација код пацијената код којих је потврђена прогресија хистолошког градуса 2 у 3 није дала значајне резултате. Хистограми добијени у првом кластеру садрже више пикова што би могло одговарати присуству више компонената у том кластеру [72].

Анапластични астроцитоми представљају интермедијерни стадијум у низу прогресије нижих градуса астроцитних тумора до глиобластома. Хистолошке карактеристике приликом проградиранија тумора, нису увек најјасније јер налаз у многоме зависи од места биопсије, због чега је веома тешко одредити када је прогресија настала.

Вредности привидног дифузионог коефицијента у првом и другом кластеру су се кретале у опсегу од $900\text{-}1300 \cdot 10^{-6} \text{mm}^2/\text{s}$. На основу ових вредности није било могуће утврдити тренутак у коме је дошло до прогресије тумора у виши градус, иако би се на основу појаве мултиплих пикова могло претпоставити да тумор садржи зоне са повећаном ћелијском густином, али и делова који имају хистолошке карактеристике примарног тумора. Међутим, терапија ДА подразумева оперативно лечење, често и палијативну зрачну терапију, што може довести до појаве радијационе некрозе и појаве МР карактеристика (зоне микронекрозе/циста или хеморагије) које нису доминантне код примарног АА од чега могу потицати вишеструки пикови у хистограму добијеном за прва два кластера [57]. Тек хистограм трећег кластера показује нормалну расподелу и према анализи претходних група астроцитних тумора одговара едему.

Ширина линије пика у прва два кластера показује нешто више вредности у односу на вредности добијене које су добијене појединачно за ДА, односно АА. Последишно и висина пика у овим кластерима је нижа, што наводи на закључак

да би требало обратити пажњу и на посттерапијски ефекат који значајно мења карактеристике код оваквих тумора.

Према добијеним параметрима, пре свега ширине и висине пика, могуће је одредити уделе појединачних компонената у читавој запремини тумора. Према *Lee W et al.* [153] производ *FWHM* и висине пика даје површину испод пика која тачније одговара 95.5% његове стварне површине. Оваквом анализом су избегнуте сложене метода интеграције, а омогућава се процена појединачних делова тумора, што је веома значајно приликом планирања оперативног лечења.

Удео компоненте који одговара првом кластеру у односу на читаву запремину тумора је испод 50% за ДА и ГБМ, док код АА удели компонената из сва три кластера су приближно исте. Хистопатолошке карактеристике ових тумора како је већ раније наведено подржавају овакав налаз и донекле потврђују претпоставку да је првом кластеру доминантан солидни део тумора. Такође, сличне вредности удела код АА и даље наводе на ограниченост примене техника сегментације на туморе који имају хомогену структуру.

МР спектроскопија и праћење терапијског одговора глиобластома

Линеарном дискриминантном анализом МР спектра добијених са кратким и средњим временом еха, применом различитих локализационих техника, показано је да према концентрацијама mI, Gly и Glx астроцитни тумори различитих градуса могу бити класификовани са успешношћу од 94,6%. Уколико се изврши класификација на основу појединачних метаболита успешност класификације се знатно смањује.

Opstad et al. [111] је већ указао на примену ЛДА у анализи МР спектра. Улазни подаци за мултиваријантне анализе су добијени интеграцијом пикова у спектру. Метода је успешно примењена за класификацију у случају диференцијалних дијагноза ГБМ и нискоградусних тумора, али без

патохистолишке потврде, са успешношћу од 90-100% [112], док су *Melssen et al.* [113] добили сличне резултате класификације примењене само на глијалне туморе. Односима испитиваног метаболита и Cr [154] односно *Celda et al* [155] који је користио воду као унутрашњи стандард. са успешношћу од 79% класификује глијалне туморе. *Somorjai et al.* [156], *Martinez-Perez et al.* [157] су у *in vitro* студији на основу концентрација аминокиселина различитих врста можданих тумора постигли успешност класификације применом ЛДА од 80-89%. У наведеним студијама су за анализу коришћени сви добије метаболити у спектру, што је могло утицати на успешност класификације.

Међутим, дефинисањем фреквенцијског опсега у којима се јављају метаболити у МР спектру и узимањем само тако дефинисаног опсега у анализу могао би се редуковати шум и присуство артефаката у спектру, што је од значаја за анализу неуротрансмитера који се на 1.5 Т најчешће преклапају са другим метаболитима услед постојања јаког спрезања спинова.

Показано је да се концентрације Glx разликују у низу од 2 до 4 са највишим добијеним вредностима за ГБМ. Овакви резултати су у складу са резултатима добијеним у литератури [158-163]. За разлику од претходних студија успешност класификације на основу измерених концентрација Glx је 89.2%. Сличне резултате запажамо и код *Manton et al.* [159] и *Nagarajana et al.* [160] за класификацију високоградусних и нискоградусних тумора када се анализира овај метаболит. *Tate et al.* [164] на основу повишених вредности односа Glx/Cr разликује олигодендроглиоме у односу на астроцитоме градуса 2.

Добијени резултати би се могли објаснити поремећајем хомеостазе глутамата изазване појавом патолошког процеса у можданом ткиву која може настати због парцијалне оксидације Glu, али и гликолизе [159,165]. Познато је да [166,167] глутаматски циклус спречава губитак α кетоглутарата из неуронског трикарбонског циклуса (*TCA-tricarboxylic acid cycle*). Када неурони ослободе глутамат и астроцити га преузму неуронски ТСА циклус губи α кетоглутарат, који ако се не може избалансирати онемогућава стварање цитрата што би имало

за последицу стопирање енергијског метаболизма. Такође, глутамат који се ослобађа из нервних завршетака у ванћелијски простор се из њега преузима процесом у коме учествују астроцити који окружују синапсе. У астроцитима глутамат реагује са амонијаком при чему се добија глутамин синтетаза, цитосолски, АТФ- зависан ензим који астроцити и олигодендроцити излучују, али неурони не. Глутамин, који нема неуротрансмитерске особине, доспева у ванћелијску течност одакле га преузимају неурони. Размена глутамата и глутамина између неурона и астроцита представља глутамински циклус. Ако је хомеостаза глутамата регулисана његове концентрације унутар ћелије у односу на ванћелијски простор су знатно више. Уколико дође до поремећаја ТСА циклуса глутамата услед настанка патолошког процеса, астроцити ослобађају значајне количине глутамата као механизам регулације запремине ћелије изазване присутним туморских процесом и вазогеним едемом. На овај начин директно се врши утицај на здраве ћелије астроцита. Наиме, превазилажење капацитета здравих астроцита за преузимање отпуштеног глутамата доводи до појаве неуротоксичности чиме се стварају услови за даљи раст тумора, што објашњава повишене концентрације овог метаболита код високоградусних тумора који имају тенденцију бржег раста.

Преузимање глутамата од стране астроцита догађа се насупрот концентрационом градијенту при чему се троши енергија АТФ-а. Утрошена енергија се надокнађује процесом гликолизе при чему настаје лактат, метаболит који се може детектовати МР спектроскопијом применом средњих и дугих времена еха. Јавља се као инвертован дублет по чему га је лако раздвојити од липидних резонанција које се јављају у истом фреквенцијском опсегу. У условима анаеробне гликолизе, лактат који напушта астроците доспева у ванћелијски простор из кога би требало да буде преузет од стране неурона. Међутим, како у присуству тумора долази до губитка неурона, лактат се не може елиминисати из ванћелијског простора и представља извор енергије туморским ћелијама [168]. Резултати добијени на $TE=135\text{ ms}$ су у складу са резултатима добијеним од стране *Hsu et al* [169] где је запажено израженије присуство овог метаболита код АА и ГБМ односу на ДА.

Губитак неурона се карактерише сниженим вредностима NAA који се сматра неуронским маркером. Најниже концентрације овог метаболита су добијене код градуса 4 што је слично са већ објављеним резултатима [151,152] што се објашњава чињеницом да су тумори високог степена малигности цитолошки атипичнији и митотички активнији него градус 2. Супституција неуронских ћелија туморским или губитак истих доводи до значајно нижих вредности код AA и ГБМ [169]. Ипак, добијено присуство NAA у МР спектру високоградусних тумора објашњено је присуством вијабилних неурона унутар инфилтративних тумора као што су глијални [79,111].

Познато је да се резонантна линија Gly у протонском МР спектру преклапа са мултиплетом mI на кратким временима еха [170,171]. Међутим, варирањем времена еха могуће је искључити утицај mI у спектру због његовог кратког T2 времена релаксације, због чега се сматра да је његов утицај на дугим времена еха занемарљив [96,97,172].

Добијени резултати су показали да се Gly јавља код високоградусних тумора, док код нискоградусних тумора нису запажене значајне концентрације овог метаболита. На основу овог параметра са успешношћу од 78.4% су класификовани различити градуси астроцитоме. Наиме, Gly се сматра инхибиторним неуротрансмитером у централном нервном систему због чега је његова заступљеност очекивана код високоградусних и нискоградусних тумора. Међутим, у *in vitro* студијама [96,97,173,174] показало се да значајно више концентрације Gly се јављају код високоградусних тумора. Познато је да је продукција Gly под утицајем онкогенезе [172,175-178], због чега се и сматра да има значајну улогу у одређивању биолошких карактеристика тумора. Повишене концентрације овог метаболита могле би бити последица поремећаја метаболизма глукозе [179]. У том случају 3-фосфоглицерат услед алтернативних метабиличких путева бива конвертован у 3-фосфосерин и даље у серин и глицин. Настали глицин даље у реакцији са ензимским комплексом глицин синтаза, којим се глицин разграђује и настаје тетрахидрофолат (ТХФ). ТХФ учествује у фолатном метаболизму (*folate one carbon metabolism-FOCM*) чији су крајњи

продукти неопходни за биосинтезу нуклеотида и метилациону реакцију. Управо ова улога Gly је искоришћена за утврђивање метилационог статуса ГБМ-а.

Међутим, интересантно је да Gly такође може настати из реакције холина и бетаина, што би могло објаснити налаз ниског Cho у тумору [180]. С друге стране, повишене концентрације Gly могле би се објаснити као последична реакција на ексцитотоксичан ниво глутамата у ванћелијском простору, нарочито код високоградусних тумора, што објашњава повишене концентрације Glx и Gly код ГБМ. Требало би нагласити да је Gly нађен само у спектрима добијеним у солидним деловима тумора. Такође, значајно је да присуство Gly није нађено код 15% пацијената са дијагностикованим ГБМ, што би могло карактерисати метилациони статус ових тумора. Наиме, у лечењу ових тумора примењује се хемиотерапеутик Темозоломид [32]. Његова улога је да изврши метилацију на тачно одређеним местима, N7-метилгуанин и N3-метиладенин, чиме модификује ДНК, али се та места брзо поправе дејством протеина, па лек губи своје цитотоксично дејство [98]. Међутим, 5-10% се веже за O6-метилгуанин према коме, уколико се метил група не уклони пре деобе ћелије, лек показује изразито цитотоксично дејство, јер у том случају не долази до активације МГМТ-а који би онемогућио метилацију и спречио дејство лека на тумор [98]. Према добијеним резултатима за метилациони статус ГБМ према појави Gly пика у МР спектру, могли би се објаснити добијени резултати присуства/одсуства истог. Истовремено то би могло да помогне у разликовању два ентитета која су уведена са усвајањем терапије Темодалом, односно појам псеудопрогресије, која представља рану терапијску секвелу [99-101]. Карактерише се развојем инфламације, великом пермеабилношћу хемато-енцефалне баријере и појавом едема, што одговара и карактеристикама рекурентног тумора. Наши резултати показују да би Gly, који се јавља у 20% добијених спектра рекурентних тумора могао бити параметар од значаја за рано утврђивање стадијума болети.

На МР спектрима са кратким временом еха доминантна резонанција на 3.56 ppm је приписана ml, који је присутан у вишим концентрацијама код нискоградусних тумора. Миоинозитол је нормално повишен код новорођенчади,

али се његова концентрација убрзо значајно смањује [181]. Његово присуство је изражено код Алцхајмерове болести, поремећаја бубрежних функција, дијабетес [182,183]. Код већине ових поремећаја повећање mI вероватно карактерише његову улогу као регулатора осмозе и/или астроцитног маркера, пре него неуротрансмитера. *Danielsen et al.* [181] налазе снижене вредности овог метаболита у појединим патолошким стањима: тумори, исхемије, док *Cheng et al* [184] указују на повећање његове концентрације код нискоградусних астроцитома. Једно од објашњења је да поједини митогени могу директно да утичу на метаболизам фосфатидилинозитола (ФИ) [185,186]. Миоинозитол је саставни део фосфатидилинозитола и чини његов фосфорилисани облик. У условима поремећаја метаболизма, ФИ се разграђује до диациглицерола и инозитол 1,4,5 трифосфата. Присуство диациглицерола активира протеин киназу Ц који даље активира протеолитичке ензиме матрикс металопротеазе (ММП) [187,188] Показано је [188] да код глиома високог градуса, инвазивност је делимично регулисана специфичним типом ММП-а кога здраве ћелије астроцита и олигодендроцита не садрже. Добијени резултати релативно ниских вредности mI код високоградусних тумора нису толико неочекивана уколико се узме у обзир конверзија mI у ФИ који се не може детектовати на МР спектру [172].

Сличне резултате налазимо и код *Righi et al* [170] где је применом техника спектралног едитовања показано да се у односу на нормално мождано ткиво код нискоградусних тумора бележи појава повишеног mI без утицаја Gly пика.

ЛДА је показала успешност класификације ДА, АА и ГБМ од 73% само на основу овог метаболита.

Спектри добијени на TE=30 ms, као и они који су добијени на TE=135 ms показали су повишене вредности укупног Cho код високоградусних тумора, али и код нискоградусних тумора.

Холин као метаболит карактерише синтезу и деградацију ћелијске мембране [189]. Повишене вредности Cho код високоградусних тумора су такође забележене и у радовима [190-193] који су показали корелацију Cho пика са

митотском и пролиферативном активношћу и степеном малигности тумора. Иако је познато да различита времена еха не утичу само на визуализацију појединих метаболита већ и на интензитет пика због разлика у T_2 временима релаксације [171,171]. Приказани резултати као ни резултати претходних студија нарочито *Majos et al.* [194] показују да није нађена статистички значајна разлика у концентрацијама овог метаболита на МР спектрима добијених са различитим временима еха.

Резултати анализе МР спектра за групу пацијената са прогресијом астроцитома 2 у виши градус показали су да појава Gly пика на МР спектрима са дугим временом еха би потенцијално могла помоћи у одређивању тренутка у коме долази до прогресије налаза. Наиме, у анализи примарних АА добијене су повишене вредности Gly за разлику од ДА код којих Gly није детектован. Иако добијени резултати указују више на присуство високоградусног тумора, не може се сасвим искључити ни утицај mI код ове групе. Како је већ наведено код пацијената са дијагностикованим ДА се приступа оперативном лечењу и зрачној терапији, што изазива појаву радијационе некрозе. *Castillo et al.* [171] су код ДА и АА у току праћења посттерапијског ефекта уочили повишене концентрације mI код оба типа тумора.

Ни на основу других метаболита није било могуће са сигурношћу препознати настанак прогресије. Многе студије указују да повишене вредности Cho и липида указују на прогресију налаза [73,74,76,111]. Међутим, како појава липидних резонанција може указивати на присуство инфламације, пролиферације, малигности, апоптозе и некрозе (195-199) није увек једноставно протумачити појаву овог метаболита у МР спектрима нарочито након примењене терапије. Касне ирадијационе промене у виду настанка некрозе се јављају као последица исхемија због оштећења крвних судова. Услед повећане капиларне пермеабилности често долази и до настанка едема, што значајно мења и морфолошку слику. Спектроскопске промене које указују на радијациону некрозу су редуковане концентрације NAA и Cho [200] али и присуство Lip/Lac резонанција. *Rock et al.* [201] као граничну вредност за разликовање туморског

тквива и некрозе узима однос Lip/Cho од 0.75, што се у студији [202-204] није показало као значајан однос за дефинисање присуства туморских ћелија и радијационе некрозе, што је веома чест налаз код оваквих тумора.

Субдиференцијација подтипова глиобластома

Према резултатима добијеним на основу фракталне анализе T_1W снимака након примене парамагнетног контрастног средства, сигнификантно више вредности фракталних димензија су добијене за неметилисане глиобластома у поређењу са метилисаним. Како интензитет сигнала на снимцима у значајној мери зависи од хистолошких карактеристика, могло би се закључити да неметилисани глиобластома показују сложенију васкуларну структуру и/или већу ћелијску густину у односу на метилисане, мада у недостатку студија које се баве проблемом хистолошких разлика метилисаних и неметилисаних тумора још не постоје јасни докази који би подржали овакву претпоставку. Иако, литературни подаци [205] применом фракталне анализе на снимке добијене *SWI* техником (*Susceptibility weighted imaging-SWI*) показују на могућност разликовања нискоградусних астроцитома од ГБМ на основу добијених вредности фракталне димензије. Примећено је и да је опсег вредности односа некрозе и дела тумора у коме долази до постконтрастног појачања у интензитету сигнала много мањи код метилисаних ГБМ [206]. Такође, средње вредности овог односа код метилисаних ГБМ указују на постојање скоро једнаких делова некроза и постконтрастног појачања што се може објаснити хетерогеношћу, „*patchy*“ пребојавању тумора, што је већ показано у поједним студијама. Нашу студију смо спровели само на T_1W снимцима због добре делинеације зона повећане васкуларности (самим тим густине ћелија) и некрозе, као и доброг раздвајања тумора од едема, што је тешко на $T_2W/FLAIR$ снимцима, која као таква према нашим сазнањима представља прву студију примене фракталне анализе на овај проблем.

7. Закључци

У овој докторској дисертацији је испитивана могућност унапређења већ постојећих метода у смислу примене независних техника класификације туморског ткива за разликовање астроцитних тумора. Такође, испитивана је могућност квантификације неуротрансмитера *in vivo* на јачини поља од 1.5 Т у циљу класификације астроцитних тумора. На основу приказаних резултата може се закључити следеће:

- ❖ Применом FCM технике кластеризације са успешношћу је тумор сегментован на унапред дефинисани број кластера. Сваки кластер је садржао одређену компоненту тумора; солидни део тумора, цистични/некротични део, зоне хеморагије и едема.
- ❖ Пошто је у анализи обухваћен цео тумор утицај субјективности који је присутан приликом ручног одабира региона од интереса је избегнут чиме се значајно смањио утицај људског фактора као извора грешке.
- ❖ Добијени хистограми за компоненту тумора која је дефинисана као солидни део и припада првом кластеру, код свих група астроцитома показује нормалну расподелу. Вредности привидног дифузионог коефицијента, ширине линије и висине пика у овом кластеру имају опадајући тренд.
- ❖ Анализа хистограма добијених за компоненту тумора која у зависности од типа астроцитома одговара солидном делу или мешовитим компонентама солидног дела и едема, а припада другом кластеру, за анапластичне астроцитоме показује сличне вредности било да се ради о вредностима ADC-а, ширине линије или висине пика што наводи на закључак да код хомогених тумора услед малих варијација вредности испитиваних

- параметара унутар групе, знатно је отежана примена техника сегментације. За преостале групе астроцитома услед њихове хетерогености ове вредности су указивале на присуство других компонената унутар кластера.
- ❖ У трећем кластеру је успешно издвојена компонента која одговара зони едема у случају дифузних и анапластичних астроцитома, али је такође показана и изузетна хетерогеност глиобластома што се огледа у изгледу њихових хистограма. Наиме, померање хистограма ка нижим вредностима указује на присуство туморских ћелија и ван солидног дела тумора.
 - ❖ На основу приказаних резултата хистограмске анализе астроцитома различитог степена малигности након извршене кластеризације, може се закључити да вредности привидног дифузионог коефицијента, као и ширине линије на висини максимума су добри показатељи у разликовању астроцитома, уколико РОИ обухвата зону солидног дела тумора.
 - ❖ Анализа МР спектра са кратким и средњим временом еха, применом различитих локализационих техника, показала је да према концентрацијама; mI, Gly и Glx астроцитни тумори различитих градуса могу бити класификовани са успешношћу од 94.6%. Уколико се изврши класификација на основу појединачних метаболита успешност класификације се знатно смањује.
 - ❖ Добијени резултати су показали да се Gly јавља код високоградусних тумора, док код нискоградусних тумора нису запажене значајне концентracије овог метаболита. Такође, анализом метилационог статуса ГБМ-а овај метаболит би могао бити директан показатељ метилационог статуса тумора, мада је неопходна даља анализа како би се установио прави значај овог параметра.

- ❖ Статистички значајна разлика је добијена за вредности fA неметилисаних ГБМ у односу на вредности добијене за метилисане ГБМ. Међутим, није нађена статистички значајна разлика у вредностима параметара fC , rNE и Su подтипова ГБМ фракталном анализом узорака.

Општи закључак који се може донети на основу презентованих резултата је да се у разликовању можданих тумора не би требало ослањати само на квантификацију привидног дифузионог коефицијента у региону од интереса који обухвата мали део лезије. Целовитију слику је могуће добити проширивањем узорка и одабира региона од интереса применом различитих техника сегментације. Такође, осим мерења концентрације холина анализу МР спектра би требало проширити и на неуротрансмитере и аминокиселине које су се показале као поуздан критеријум у разликовању астроцитома различитог степена малигности. Студију би свакако требало проширити у циљу даљег испитивања повезаности метилационог статуса и резистенције глиобластома на хемиотерапију што би у будућности имало значајан клинички утицај на избор терапије.

8. Литература

- [1] National Cancer Institute. Trends in SEER incidence and U.S. mortality using the joinpoint regression program 1975-2000 with up to three joinpoints by race and sex. U: Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Edwards BK. SEER Cancer Statistics Review, 1975- 2000. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2003., Section 3: Brain and Other Nervous System Cancer (Invasive), Table III-1.
- [2] Sutherland GR, Florell R, Louw D, Choi NW, Sima AA. “Epidemiology of primary intracranial neoplasms in Manitoba, Canada”. *Can J Neurol Sci* 1987; 14:586-592.
- [3] Levin VA, Leibel SA, Gutin PH. “Neoplasms of the central nervous system. U: Practice of Oncology”. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 2100-2160.
- [4] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, urednici. World Health Organization Classification of tumours of the central nervous system. Lyon, France: IARC Press, 2010.
- [5] Mercer RW, Tyler MA, Ulasov IV, Lesniak MS. “Targeted therapies for malignant glioma: Progress and potential”. *BioDrugs*. 2009;23:25–35.
- [6] Young RJ, Knopp EA. “Brain MRI: tumor evaluation”, *J Magn Reson Imaging* 2009; 24:709-24.
- [7] Bruzzzone MG, D'Incerti L, Farina LL, Cuccarini V, Finocchiaro G. “CT and MRI of brain tumors”. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2012;56:112-37.
- [8] Sugahara T, Korogi Y, Kochi M, Ikushima I, Shigematu Y, Hirai T, Okuda T, Liang L, Ge Y, Komohara Y, Ushio Y, Takahashi M. “Usefulness of diffusionweighted MRI with echo-planar technique in the evaluation of cellularity in gliomas”. *J Magn Reson Imaging* 1999; 9:53-60.
- [9] Kono K, Inoue Y, Nakayama K, Shakudo M, Morino M, Ohata K, Wakasa K, Yamada R. “The role of diffusion-weighted imaging in patients with brain tumors”. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22:1081-1088.
- [10] Calvar JA, Meli FJ, Romero C, Calcagno ML, Yáñez P, Martínez AR, et al. “Characterization of brain tumors by MRS, DWI and Ki-67 labeling index”. *J Neurooncol* 2005;72:273–80.

- [11] Chenevert TL, Sundgren PC, Ross BD. “Diffusion imaging: insight to cell status and cytoarchitecture”. *Neuroimaging Clin N Am* 2006;16:619–32.
- [12] Hayashida Y, Hirai T, Morishita S, Kitajima M, Murakami R, Korogi Y, et al. “Diffusion-weighted imaging of metastatic brain tumors: comparison with histologic type and tumor cellularity”. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;27:1419–25.
- [13] Gering DT, Grimson WEL, Kikinis R. “Recognizing deviations from normalcy for brain tumor segmentation”. In *Proceedings of the 5th International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention, Toky* 2002; 388–395.
- [14] Fletcher-Heath LM, Hall LO, Goldgof DB, Murtagh FR. “Automatic segmentation of non-enhancing brain tumors in magnetic resonance images”. *Artificial Intelligence in Medicine* 2001; 21:43–63.
- [15] Kaus M, Warfield SK, Nabavi A, Black PM, Jolesz FA, Kikinis R. “Automated segmentation of MRI of brain tumors”. *Radiology* 2001; 218:586–591.
- [16] Kaus M, Warfield SK, Nabavi A, Chatzidakis E, Black PM, Jolesz FA, Kikinis R. “Segmentation of meningiomas and low grade gliomas in MRI”. In *Proceedings of the 2nd International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention Cambridge* 1999;1–10.
- [17] Srinivasan V, Rajenderan G, Kuzhali V, Aruna J. “Fuzzy fast classification algorithm with hybrid of ID3 and SVM”, *Journal of Intelligent & Fuzzy Systems* 2013;24:555-561.
- [18] Bizzarri M, Guliani A, Cucina A, D’Anselmi F, Soto AM, Sonnenschein C. “Fractal analysis in a systems biology approach to cancer”. *Seminars in Cancer Biology* 2011;21:175-182.
- [19] Borys P, Krasowska M, Grzywna ZJ, Djamgoz MBA, Mycielska ME. “Lacunarity as a novel measure of cancer cells behavior”. *Byosystems* 2008;94:276-281.
- [20] Dokukin ME, Guz NV, Gaikwad RM, Woodworth CD, Sokolov I. “Cell surface as fractal: normal and cancerous cervical cells demonstrate different fractal behaviour of surface adhesion maps at the nanoscale” *Physical Review Letters* 2011;107: 028101-14.

- [21] Cha S. "Update on brain tumour imaging: from anatomy to physiology". *Am J Neuroradiol* 2006; 27:475–487.
- [22] Osborn OA, Salzman KL, Barkovich J, et al. "Diagnostic imaging brain". Amirsys; 2010.
- [23] Abbas K, Mitchell F. Robbins basic pathology. 8th ed. Saunders Elsevier; 2007.
- [24] Schiffers D. "Brain tumor pathology: Current diagnostic hotspots and pitfalls". Springer; 2006.
- [25] Gladson CL, Prayson RA, Liu WM. "The pathobiology of glioma tumors. *Annu Rev Pathol*". 2010;5:33-50.
- [26] Louis DN. "Molecular pathology of malignant gliomas". *Annu Rev Pathol*. 2006;1:97-117.
- [27] Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP. "Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations". *Cancer Res*. 1993;53:2736-9.
- [28] Ino Y, Silver JS, Blazejewski L, Nishikawa R, Matsutani M, Von Deimling A et al. "Common regions of deletion on chromosome 22q12.3-q13.1 and 22q13.2 in human astrocytomas appear related to malignancy grade". *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999;58:881-5.
- [29] Schrock E, Blume C, Meffert MC, du Manoir S, Bersch W, Kiessling M et al. "Recurrent gain of chromosome arm 7q in low-grade astrocytic tumors studied by comparative genomic hybridization". *Genes Chromosomes Cancer*. 1996;15:199-205.
- [30] Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007;170:1445-53.
- [32] Kleihues P, Sobin LH. "World Health Organization classification of tumors". *Cancer*. 2000;88:2887.
- [32] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M et al. "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma". *N Engl J Med*. 2005;352:997-1003.
- [33] Bloch F, Hansen WW, Packard M. "Nuclear induction". *Phys Rev* 1946; 69:127.
- [34] Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. "Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid". *Phys Rev* 1946; 69:37-38.

- [35] Damadian R. NMR in cancer. *Physiol Chem Phys*. 1977; 9:97-100.
- [36] Lauterbur PC. "Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance". *Nature* 1973; 242:190-191.
- [37] Horowitz AL. "MRI Physics for Physicians", Springer-Verlag, New York, 1989
- [38] Fick AE. "Über Diffusion". *Annalen der Physik* 1855; 94:59-86.
- [39] Einstein A. "Von der molekulärkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen". *Annalen der Physik* 1905; 17:549-554.
- [40] Le Bihan D. "Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI". *Nature Reviews Neuroscience* 2003;4:469-480.
- [41] Schaefer PW, Grant PE, Gonzalez RG. Diffusion-weighted MR imaging of the brain. *Radiology* 2000; 217:331-345.
- [42] Stejskal E, Tanner J. "Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient". *J Chem Phys* 1965; 42:288-292.
- [43] Huisman TAGM. "Diffusion-weighted imaging: Basic concepts and application in cerebral stroke and head trauma". *Eur Radiol* 2003; 13:2283-2297.
- [44] Okamoto K, Ito J, Ishikawa K, Sakai K, Tokiguchi S. "Diffusion-weighted echoplanar MR imaging in differential diagnosis of brain tumors and tumorlike conditions". *Eur Radiol* 2000; 10:1342-1350.
- [45] Norris DG, Niendorf T Leibfritz D. "Health and infarcted brain tissues studied at short diffusion times: the origins of apparent restriction and the reduction in apparent diffusion coefficient". *NMR Biomed* 1994; 7:304-310.
- [46] Muti M, Aprile I, Principi M, Italiani M, Guiducci A, Giulianelli G, Ottaviano P. "Study on the variations of the apparent diffusion coefficient in areas of solid tumor in high grade gliomas". *Magn Reson Imaging* 2002; 20:635-641.
- [47] Pauleit D, Langen KJ, Floeth F, Hautzel H, Riemenschneider MJ, Reifenberger G, Shah NJ, Muller HW. "Can the apparent diffusion coefficient be used as a noninvasive parameter to distinguish tumor tissue from peritumoral tissue in cerebral gliomas?" *J Magn Reson Imaging* 2004; 20:758-764.
- [48] Stadnik TW, Demaerel P, Luypaert RR, Chaskis C, Van Rompaey KL, Michotte A, Osteaux MJ. "Imaging tutorial: differential diagnosis of bright lesions on diffusion-weighted MR images". *Radiographics* 2003; 23:e7-e7.

- [49] Cha SM, Lupo MH. "Differentiation of glioblastoma multiforme and single brain metastasis by peak height and percentage of signal intensity recovery derived from dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion mr imaging". *Am J Neuroradiology* 2007; 28:1078-84.
- [50] Baehring JM, Bi WL, Bannykh S, Piepmeier JM, Fulbright RK. "Diffusion MRI in the early diagnosis of malignant glioma". *J Neurooncology* 2007; 82: 221-225.
- [51] Yamasaki F, Kurisu K, Satoh K, Sugiyama K, Ohtaki M, Tominaga A, Hanaya R, Yoshioka H, Hama S, Ito Y, Kajiwara Y, Yahara K, Saito T, Thohar MA. "Apparent diffusion coefficient of human brain tumors at MR Imaging", *Radiology* 2005; 235:985-991.
- [52] Yang D, Korogi Y, Sugahara T, Kitajima M, Shigematsu Y, Liang L, Ushio Y, Takahashi M. "Cerebral gliomas: prospective comparison of multivoxel 2D chemical-shift imaging proton MR spectroscopy, echoplanar perfusion and diffusion-weighted MRI". *Neuroradiology* 2002; 44:656-666.
- [53] Guo AC, Cummings TJ, Dash RC, Provenzale JM. "Lymphomas and highgrade astrocytomas: comparison of water diffusibility and histologic characteristics". *Radiology* 2002; 224:177-183.
- [54] Lam WW, Poon WS, Metreweli C. "Diffusion MR imaging in glioma: does it have any role in the pre-operation determination of grading of glioma?" *Clin Radiol* 2002; 57:219-225.
- [55] Jager HR, Waldman AD, Benton C, Fox N, Rees J. "Differential chemosensitivity of tumor components in a malignant oligodendroglioma: assessment with diffusion-weighted, perfusion-weighted, and serial volumetric imaging". *AJNR Am J Neuroradiol* 2005; 26:274-278.
- [56] Brunbeg JA, Chenevert TL, McKeever PE, Ross DA, Junck LR, Muraszko KM, Dauser R, Pipe JG, Betley AT. "In vivo MR determination of water diffusion coefficients and diffusion anisotropy: Correlation with structural alteration in gliomas of the cerebral hemispheres". *AJNR Am J Neuroradiol* 1995; 16:361-371.
- [57] Watanabe M, Tanaka R, Takeda N. "Magnetic resonance imaging and histopathology of cerebral gliomas". *Neuroradiology* 1992; 34:463-469.

- [58] Johnson PC, Hunt SJ, Drayer BP. "Human cerebral gliomas: correlation of postmortem imaging findings and neuropathologic findings". *Radiology* 1989; 170:211-217.
- [59] Kelly PJ, Daumas-Duport C, Kispert DB, Kall BA, Scheithauer BW, Illig JJ. "Imaging-based stereotaxic serial biopsies in untreated intracranial neoplasms". *J Neurosurg* 1987; 66:865-874.
- [60] Moritani T, Ekholm S, Westesson PL. "Diffusion-weighted mr imaging of the brain". Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2005.
- [61] Takayasu T, Yamasaki F, Tominaga A, Hidaka T. "A pituitary abscess showing high signal intensity on diffusion-weighted imaging". *Neurosurgery Review* 2006; 29: 246– 248.
- [62] Cartes-Zumelzu FW, Stavrou I, Castillo M, Eisenhuber E, Knosp E, Thurnher MM. "Diffusion-weighted imaging in the assessment of brain abscesses therapy". *Am J Neuroradiology* 2004; 25: 1310-1317.
- [63] Tzika AA, Zarifi MK, Goumnerova L, Astrakas LG, Zurakowski D, Young-Poussaint T, Anthony DC, Scott RM, Black P McL. "Neuroimaging in pediatric brain tumors: Gd-DTPA-enhanced, hemodynamic, and diffusion MR imaging compared with MR spectroscopic imaging". *AJNR Am J Neuroradiol* 2002; 23:322-333.
- [64] Van den Bent MJ, Hegi ME, Stupp R. Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours. *Eur. J. Cancer.* 2006;42:582–588.
- [65] Tien R, Felsberg G, Friedman H, Brown M, MacFall J. "MR imaging of highgrade cerebral gliomas: value of diffusion-weighted echoplanar pulse sequences". *AJR Am J Roentgenol* 1994; 162:671-677.
- [66] Provenzale JM, McGraw P, Mhatre P, Guo AC, Delong D. "Peritumoral brain regions in gliomas and meningiomas: investigation with isotropic diffusion weighted MR imaging and diffusion-tensor MR imaging". *Radiology* 2004; 232:451-460.
- [67] Castillo M, Smith JK, Kwock L, Wilber K. "Apparent diffusion coefficients in the evaluation of high-grade cerebral gliomas". *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; 22:60-64.
- [68] Bulakbasi N, Kocaoglu M, Ors F, Tayfun C, Ucoz T. "Combination of singlevoxel proton MR spectroscopy and apparent diffusion coefficient calculation in the evaluation of common brain tumors". *AJNR Am J Neuroradiol* 2003; 23:225-233.

- [69] Jensen JH, Helpert JA, Ramani A, Lu H, Kaczynski K. "Diffusional kurtosis imaging: the quantification of non-gaussian water diffusion by means of magnetic resonance imaging". *Magn Reson Med* 2005;53:1432–40.
- [70] Hui ES, Cheung MM, Qi L, Wu EX. "Advanced MR diffusion characterization of neural tissue using directional diffusion kurtosis analysis". *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2008;2008:3941–4.
- [71] Jensen JH, Falangola MF, Hu C, Tabesh A, Rapalino O, Lo C, et al. "Preliminary observations of increased diffusional kurtosis in human brain following recent cerebral infarction". *NMR Biomed* 2011;24:452–7.
- [72] Tozer DJ, Jäger HR, Danhaivijitr N, Benton CE, Tofts PS, Rees JH, Waldman AD. "Apparent diffusion coefficient histograms may predict lowgrade glioma subtype". *NMR Biomed* 2007; 20:49-57.
- [73] Ross B, Michaelis T. "Clinical applications of magnetic resonance spectroscopy". *Magnetic Resonance Quarterly* 1994; 10:191–247.
- [74] Fan G, Sun B, Wu Z, Guo Q, Guo Y. "In vivo single-voxel proton MR spectroscopy in the differentiation of high-grade gliomas and solitary metastases". *Clinical Radiology* 2004; 59:77–85.
- [75] De Graaf RA. *In vivo NMR spectroscopy: Principles and Techniques*. 2nd ed. John Wiley & Sons; 2007.
- [76] Kinoshita Y, Yokota A. "Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using in vitro proton magnetic resonance spectroscopy". *NMR Biomed*. 1997;10:2-12.
- [77] Kreis R. "Quantitative localized ¹H MR spectroscopy for clinical use". *Prog. Nucl. Magn, Reson*.1997;31:155-195.
- [78] McRobbie DW. "MRI from picture to proton". Cambridge University Press; 2003.
- [79] Howe FA, Barton SJ, Cudlip SA, Stubbs M, Saunders DE, Murphy MM, Wilkins PR, Opstad KS, Doyle VL, McLean MC, Bell BA, Griffiths JR. "Metabolic profiles of human brain tumors using quantitative in vivo ¹H magnetic resonance spectroscopy". *Magnetic Resonance in Medicine* 2003;49:223–232.

- [80] Furuya S, Naruse S, Ide M, Morishita H, Kizu O, Ueda S, Maeda T. "Evaluation of metabolic heterogeneity in brain tumors using ^1H -chemical shift imaging method". *Neurosurgery* 1997; 10:25–30.
- [81] Tong Z, Yamaki T, Harada K, Houkin K. "In vivo quantification of the metabolites in normal brain and brain tumors by proton MR spectroscopy using water as an internal standard". *Magnetic Resonance Imaging* 2004; 22:735–742.
- [82] Nelson SJ, McKnight TR, Henry RG. "Characterization of untreated gliomas by magnetic resonance spectroscopic imaging". *Neuroimaging Clin N Am.* 2002;12:599–613.
- [83] Gupta RK, Cloughesy TF, Sinha U, et al. "Relationships between choline magnetic resonance spectroscopy, apparent diffusion coefficient and quantitative histopathology in human glioma". *J Neurooncol.* 2000;50:215–226.
- [84] Chavarria L, Alonso J, García-Martínez R, Simón-Talero M, Ventura-Cots M, Clara Ramírez C, Torrens M, Vargas V, Rovira A, Córdoba J. "Brain magnetic resonance spectroscopy in episodic hepatic encephalopathy". *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013; 33: 272–277.
- [85] Moreno-Torres A, Martínez-Pérez I, Baquero M, Campistol J, Capdevila A, Arús C, et al. "Taurine detection by proton magnetic resonance spectroscopy in medulloblastoma: Contribution to noninvasive differential diagnosis with cerebellar astrocytoma". *Neurosurgery.* 2004;55:824–9.
- [86] Hennermann J. "Clinical variability in glycine encephalopathy". *Future Neurol.* 2006;1:621-630.
- [87] Preul MC, Caramanos Z, Collins DL, Villemure JG, Leblanc R, Olivier A, Pokrupa R, Arnold DL. "Accurate, noninvasive diagnosis of human brain tumors by using proton magnetic resonance spectroscopy". *Nature Medicine* 1996; 2:323– 325.
- [88] Miller BL, Chang L, Booth R, Ernst T, Cornford M, Nikas D, Jenden DJ. "In vivo ^1H MRS choline: correlation with in vitro chemistry/histology". *Life Sci* 1996; 58:1929-1935.
- [89] Tedeschi G, Lundbom N, Raman R, Bonavita S, Duyn JH, Alger JR, Di Chiro G. "Increased choline signal coinciding with malignant degeneration of cerebral gliomas: a

serial proton magnetic resonance spectroscopy imaging study". J Neurosurg 1997; 87:516-524.

[90] Shimizu H, Kumabe T, Shirane R, Yoshimoto T. "Correlation between choline level measured by proton MR spectroscopy and Ki-67 labeling index in gliomas". AJNR Am J Neuroradiol 2000; 21:659-665.

[91] Law M, Yang S, Wang H et al. "Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging". Am J Neuroradiol, 2003; 24: 1989-1998.

[92] Hall WA, Martin A, Liu H et al. "Improving diagnostic yield in brain biopsy: coupling spectroscopic targeting with real-time needle placement". J Magn Reson Imaging, 2001;13:12-15.

[93] Tkac I, Rao R, Georgieff MK, Gruetter R. "Developmental and Regional Changes in the Neurochemical Profile of the Rat Brain Determined by In Vivo ¹H NMR Spectroscopy" Magn. Reson. Med. 2003; 50: 24-32.

[94] Anderson CM, Swanson RA. "Astrocyte glutamate transport; review of properties, regulation and physiological functions". Glia 2000; 32:1-14.

[95] Schousboe A, Waagepetersen HS. "Role of Astrocytes in Glutamate Homeostasis: Implications for Excitotoxicity", Neurotoxicity Research 2005;8:221-225.

[96] Hattingen E, Raab P, Franz K, Zanella FE, Lanfermann H, Pilatus U. "Myo-Inositol: a marker of reactive astrogliosis in glial tumors?" NMR Biomed 2008; 21: 233-241.

[97] Hattingen E, Lanfermann H, Quick J, Franz K, Zanella FE, Pilatus U. "¹H MR spectroscopic imaging with short and long echo time to discriminate glycine in glial tumours". MAGMA 2009; 22: 33-41.

[98] Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR "Correlation of O6-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation With Clinical Outcomes in Glioblastoma and Clinical Strategies to Modulate MGMT Activity", J Clin Oncol 2008; 26:4189-4199.

- [99] Brandsma D, Stalpers L, Taal W, et al. "Clinical features, mechanisms and management of pseudoprogression in malignant gliomas". *Lancet Oncol.* 2008;9: 453–61.
- [100] Pruzincova L, Steno J, Srbecky M, et al. "MR imaging of late radiation therapy and chemotherapy-induced injury: a pictorial essay". *Eur Radiol.* 2009; 19: 2716-27.
- [101] Brandsma D, Van den Bent MJ. "Pseudoprogression and pseudoresponse in the treatment of gliomas". *Curr Opin Neurol.* 2009;22:633-8.
- [102] MacQueen JB, "Some methods for classification and analysis of multivariate observations", In: *Proceedings of Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*, Berkley, California: University of California Press; 1967;281-97.
- [103] Udupa JK, Samarasekera S "Fuzzy connectedness and object definition: Theory, algorithms and applications in image segmentation" *Graphical Models and image processing* 1996;58:246-261.
- [104] Warfield SK, Kaus M, Jolesz FA, Kikinis R. "Adaptive, template moderated, spatially varying statistical classification". *Medical Image Analysis*, 2000;4:43–55.
- [105] Dubois D, Prade H. "Gradual elements in a fuzzy set". *Soft Comput.* 2008;12:165.
- [106] Kobash S, Udupa JK. "Fuzzy object model based fuzzy connectedness image segmentation of newborn brain MR images". *IEEE International Conference on SMC.* 2012:1422-1427.
- [107] Chen W, Giger ML, Bick U. "A fuzzy c-means (FCM)-based approach for computerized segmentation of breast lesions in dynamic contrast-enhanced MR images". *Acad Radiol.* 2006;13:63-72.
- [108] Hsieh TM, Liu MY, Liao CC, Xiao F, Chiang JI, Wong MJ. "Automatic segmentation of meningioma from non-contrasted brain MRI integrating fuzzy clustering and region growing". *BMC Med Inform Decis Mak.* 2011;11:54.
- [109] Costanza MC, Afifi, AA. "Comparison of stopping rules for forward stepwise discriminant analysis". *Journal of the American Statistical Association.* 1979;74:777-785.

- [110] Fisher RA. "The use of multiple measurements in taxonomic problems". *Annals of Eugenics*. 1936;7:179-188.
- [111] Opstad KS, Murphy MM, Wilkins PR, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. "Differentiation of metastases from high-grade gliomas using short echo time 1H spectroscopy". *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2004;20:187–192.
- [112] Devos A, Lukas L, Suykens JAK, Vanhamme L, Tate AR, Howe FA, Majos C, Moreno-Torres A, Van der Graaf M, Arus C, Van Huffel S. "Classification of brain tumours using short echo time 1H MR spectra". *Journal of Magnetic Resonance* 2004;170:164–175.
- [113] Melssen W, Wehrens R, Buydens L. "Supervised Kohonen networks for classification problems". *Chemometr Intell Lab* 2006;83:99–113.
- [114] Mandelbort BB. "Stochastic models for the Earth's relief, the shape and the fractal dimension of the coastlines, and the number-area rule for islands". *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3825-8.
- [115] Goldberger AL, Amaral LAN, Hausdorff JM, Ivanov PCh, Peng C-K, Stanley HE. "Fractal dynamics in physiology: Alterations with disease and aging". *PNAS* 2002;99:2466-2472.
- [116] Russel D, Hanson J, Ott E. "Dimension of strange attractors", *Physical Review Letters* 1980;45:1175-1178.
- [117] Mandelbrot BB. "The Fractal Geometry of Nature". New York: W.H. Freeman, 1982.
- [118] Wojdyr M. "Fityk: a general-purpose peak fitting program". *J. Appl. Cryst.* 2010;43:1126-1128.
- [119] Simmons A, Tofts PS, Barker GJ, Arridge SR "Sources of intensities nonuniformity in spin echo images at 1.5 T" *Magnetic resonance in medicine* 1994;32:121-128.
- [120] Condon BR, Patterson et al. "Image nonuniformity in magnetic resonance imaging its magnitude and methods for its correction". *The british journal of radiology* 1989;60: 83-87.
- [121] Brinkmann BH, Manduca A, Robb RA. "Optimized homomorphic unsharp masking for MR grayscale inhomogeneity correction". *IEEE trans on medical imaging* 1998; 17:161-171.

- [122] Meyer CR, Peyton HB, Pipe J. "Retrospective correction of intensity inhomogeneities in MRI". IEEE trans on medical imaging 1995;14:36-41.
- [123] Sled JG, Zijdenbos AP, Evans A. "A nonparametric method for automatic correction of intensities nonuniformity in MRI data". IEEE trans on medical imaging 1998; 17:87-97.
- [124] Lee SK, Warner MW. "Post-acquisition correction of MR inhomogeneities" Magnetic Resonance in medicine 1996; 36:276-286.
- [125] Clark MC, Hall LO, Goldgof DB, Velthuizen R, Murtagh FR, Silbiger MS. "Automatic tumor segmentation using knowledge-based techniques". IEEE Transactions on Medical Imaging 1998;17:187–201.
- [126] Johnston B, Atkins MS, Mackiewicz B and Anderson M. "Segmentation of multiple sclerosis lesion in intensity corrected multispectral MRI" IEEE Trans. On medical imaging 1996;15:154-169.
- [127] Lim KO, Pfefferbaum A. "Segmentation of MRI brain image into cerebral fluid and white matter" Journal of computer assisted tomography 1989;13:588-593.
- [128] Bezdec JC Hall LO and Clarke LP. "Review of MR image segmentation techniques using pattern recognition". Medical Physics 1993;20:1033-1048.
- [129] Brandt ME Bohan TP Kramer LA, Fletcher JM. "Estimation of CSF, white and gray matter volumes in hydrocephalic children using fuzzy clustering of MR images" Computerized medical imaging and Graphics 1994;18:25-34.
- [130] Liew AW Chung, Yan H. "An Adaptive Spatial Fuzzy Clustering Algorithm for 3-D MR Image Segmentation". IEEE transactions on medical imaging 2003;22:1063-75.
- [131] Kang BY, Kim DW, Li Q. "Spatial homogeneity-based fuzzy c-means algorithm for Image segmentation". In FSKDLNAI 2005;3613:462–469.
- [132] Ahmed MN, Yamany SM, Mohamed N, Farag AA, Moriarty T., "A Modified Fuzzy c-Means Algorithm for Bias Field Estimation and Segmentation of MRI Data," IEEE Transactions on Medical Imaging 2002;21:193-199.
- [133] Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH. "Central nervous system tumors". Mayo Clin Proc 2007; 82:1271-1286.

- [134] Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre J-Y. "Primary brain tumours in adults". *Lancet* 2003; 361:322-331.
- [135] Parizel PM, Van Goethem J, van den Hauwe L, Salgado R, Vandervliet E, Leemans A. "Characterization of brain tumors". *Neuroradiology* 2005; 47:80-83.
- [136] Higano S, Yun X, Kumabe T, Watanabe M, Mugikura S, Umetsu A, Sato A, Yamada T, Takahashi S. "Malignant astrocytic tumors: Clinical importance of apparent diffusion coefficient in prediction of grade and prognosis". *Radiology* 2006; 241:839-846.
- [137] Kitis O, Altay H, Calli C, Yuntun N, Akalin T, Yurtseven T. "Minimum apparent diffusion coefficients in the evaluation of brain tumors". *Eur J Radiol* 2005; 55:393-400.
- [138] Egelhoff JC, Ross JS, Modic MT, Masaryk TJ, Estes M. "MR imaging of metastatic GI adenocarcinoma in brain". *AJNR Am J Neuroradiol* 1992; 13:1221-1224.
- [139] Holtas S, Geijer B, Stromblad LG, Maly-Sundgren P, Burtscher IM. A ringenhancing metastasis with central high signal on diffusion-weighted imaging and low apparent diffusion coefficients. *Neuroradiology* 2000; 42:824-827.
- [140] Tanaka H, Yoshida S, Fujii Y, Ishii C, Tanaka H, Koga F, Saito K, Masuda H, Kawakami S, Kihara K. "Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in the differentiation of angiomyolipoma with minimal fat from clear cell renal cell carcinoma". *Int J Urol* 2011;18:727-30.
- [141] Resmi A, Thomas T, Thomas B. "A novel automatic method for extraction of glioma tumour, white matter and grey matter from brain magnetic resonance images" *Biomed Imaging Interv J* 2013;9:e21.
- [142] Resmi A, Tessamma T. "Automatic Detection and Classification of Glioma Tumors using Statistical Features". *International Journal of Emerging Technologies in Computational and Applied Sciences* 2014;7:08-14.
- [143] Sadeghi N, Camby I, Goldman S, Gabius HJ, Baleriaux D, Salmon I, Decaesteckere C, Kiss R, Metens T. "Effect of hydrophilic components of the extracellular matrix on quantifiable diffusion-weighted imaging of human gliomas: preliminary results of correlating apparent diffusion coefficient values and hyaluronan expression level". *AJR Am J Roentgenol* 2003;181:235-241.

- [144] Lu C, Shervington A. “Chemoresistance in gliomas”. *Mol. Cell Biochem.* 2008;312:71–80.
- [145] Riemenschneider MJ, Reifenberger G. “Novel insights into the pathogenesis of gliomas based on large-scale molecular profiling approaches”. *Curr. Opin. Neurol.* 2009;22:619–624.
- [146] Steens SC, Admiraal-Behloul F, Schaap JA, et al. “Reproducibility of brain ADC histograms”. *Eur Radiol* 2004; 14:425–430.
- [147] Pronin IN, Kornienko VN, Fadeeva LM, Rodionov PV, Golanov AV. “Diffusion-weighted image in the study of brain tumors and peritumoral edema”. *Zh Vopr Neurokhir Im N N Burdenko* 2000; 3:14-16.
- [148] DiCostanzo A, Scarabino T, Trojsi F, Giannatempo GM, Popolizio T, Catapano D, Bonavita S, Maggioletti N, Tosetti M, Salvolini U, d'Angelo VA, Tedeschi G. “Multiparametric 3T MR approach to the assessment of cerebral gliomas: tumor extent and malignancy”. *Neuroradiology* 2006;48:622-631.
- [149] Strugar JG, Criscuolo GR, Rothbart D, Harrington WN. “Vascular endothelial growth/permeability factor expression in human glioma specimens: correlation with vasogenic brain edema and tumor-associated cysts”. *J Neurosurg* 1995; 83:682-689.
- [150] Hossman KA, Bloink M. “Blood flow and regulation of blood flow in experimental peritumoral edema”. *Stroke* 1981; 12:211-217.
- [151] Burger P. “Classification, grading, and patterns of spread of malignant gliomas”. Park Ridge: American Association of Neurological Surgeons 1990;3-17.
- [152] Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA. “Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications”. *Cancer* 1985;56:1106-1111.
- [153] Lee W, Kim W. “Texture Segmentation by Unsupervised Learning and Histogram Analysis Using Boundary Tracing”, *CIS* 2005;25–32.
- [154] Martinez-Bisbal MC, Celda B, Marti-Bonmati L, Ferrer P, Revert-Ventura AJ, Piquer J, Molla E, Arana R, Dosda-Munoz R. “The contribution of magnetic resonance spectroscopy for the classification of high grade glial tumours. The predictive value of macromolecules”. *Revista de Neurologia* 2002;34:309-313.
- [155] Celda B, Monleón D, Martínez-Bisbal MC, Esteve V, Martínez-Granados B, Piñero E, Ferrer R, Piquer J, Martí-Bonmatí L, Cerver “MRS as endogenous molecular

imaging for brain and prostate tumors: FP6 project"eTUMOR" *Adv Exp Med Biol.* 2006;587:285-302.

[156] Somorjai RL, Dolenko B, Nikulin AK, Pizzi N, Scarth G, Zhilkin P, Halliday W, Fewer D, Hill N, Ross I, West M, Smith ICP, Donnelly SM, Kuesel AC, Briere KM. "Classification of 1H MR spectra of human brain neoplasms: the influence of preprocessing and computerized consensus diagnosis on classification accuracy". *J. Magn. Reson. Imaging* 1996;6:437– 444.

[157] Martı́nez-Pe´rez I, Maxwell RJ, Howells SL, Van den Bogaart A, Mazucco R, Griffiths JR, Arus C. "Pattern recognition analysis of 1H NMR spectra from human brain tumour biopsies". *Proc.Soc. Magn. Reson.* 1995;3rd Annual Meeting. P1709.

[158] Takano T, Lin JHC, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M. "Glutamate release promotes growth of malignant gliomas" *Nature Medicine* 2001;7:1010 – 1015.

[159] Manton DJ, Lowry M, Rowland-Hill C, Crooks D, Mathew B, Turnbull LW. "Combined proton MR spectroscopy and dynamic contrast enhanced MR imaging of human intracranial tumours in vivo". *NMR Biomed* 2000;13:449-459.

[160] Nagarajan N, Quast C, Boxall AR, Shahid M, Rosenmund C. "Mechanism and impact of allosteric AMPA receptor modulation by the ampakine CX546". *Neuropharmacology.* 2001;41:650-63.

[161] Stadlbauer A, Gruber S, Nimsky C, Fahlbusch R, Hammen T, Buslei R, Tomandl B, Moser E, Ganslandt O. "Preoperative grading of gliomas by using metabolite quantification with high-spatial-resolution proton MR spectroscopic imaging". *Radiology* 2006;238:958–969.

[162] Nelson SJ. "Magnetic resonance spectroscopic imaging". *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 2004;23:30–39.

[163] Nelson SJ, Vigneron DB, Dillon WP. "Serial evaluation of patients with brain tumors using volume MRI and 3D 1H MRSI". *NMR in Biomedicine* 1999;12:123–138.

[164] Tate AR, Majos C, Moreno A, Howe FA, Griffiths JR, Arus C. "Automated classification of short echo time in in vivo 1H brain tumor spectra: a multicenter study". *Magnetic Resonance in Medicine* 2003;49:29–36.

[165] Hertz L, Rothman DL. "Glutamine-Glutamate Cycle Flux Is Similar in Cultured Astrocytes and Brain and Both Glutamate Production and Oxidation Are Mainly Catalyzed by Aspartate Aminotransferase". *Biology* 2017; 6:17.

- [166] Kimelberg H, Goderie S, Higman S, Pang S, Waniewski R., “Swelling-induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocytic cultures”, *Journal of Neuroscience* 1990;10:1583-1591.
- [167] Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. “Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reverse uptake”, *Nature* 2000;403:16-321.
- [168] Möller-Hartmann W, Herminghaus S, Krings T, Marquardt G, Lanfermann H, Pilatus U, Zanella FE. “Clinical application of proton magnetic resonance spectroscopy in the diagnosis of intracranial mass lesions”. *Neuroradiology*. 2002;44:371-81.
- [169] Hsu YY, Chang CN, Wie KJ, Lim KE, Hsu WC, Jung SM. “Proton magnetic resonance spectroscopic imaging of cerebral gliomas: correlation of metabolite ratios with histopathological grading”. *Chang Gung Med* 2004;27:399—407.
- [170] Righi V, Andronesi OC, Mintzopoulos D, Black PM, Tzika AA. “High resolution magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy detects glycine as a biomarker in brain tumors”. *Int J Oncol* 2010;36: 301–306.
- [171] Castillo M, Smith JK, Kwock L. “Correlation of myo-inositol levels and grading of cerebral astrocytomas”. *American Journal of Neuroradiology* 2000;21:1645– 1649.
- [172] London A, Castillo M, Armao D, Kwock L, Suzuki K. “Unusual MR Spectroscopic imaging pattern of an astrocytoma: lack of elevated choline and high myo-inositol and glycine levels”. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003;24:942-945.
- [173] Lehnhardt FG, Bock C, Rohn G, Ernestus RI, Hoehn M. “Metabolic differences between primary and recurrent human brain tumors: a ¹H NMR spectroscopic investigation”. *NMR Biomed*. 2005;18:371–382.
- [174] Tugnoli V, Schenetti L, Mucci A, Nocetti L, Toraci C, Mavilla L, Basso G, Rovati R, Tavani F, Zunarelli E, Righi V, Tosi MR. “A comparison between *in vivo* and *ex vivo* HR-MAS ¹H MR spectra of a pediatric posterior fossa lesion”. *Int. J. Mol. Med*. 2005;16:301–307.
- [175] Locasale JW. “Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle”. *Nature Reviews Cancer* 2013;13:572–583.

- [176] Huisman TA, Thiel T, Steinmann B, Zeilinger G, Martin E. "Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain of a neonate with nonketotic hyperglycinemia: in vivo-in vitro (ex vivo) correlation". *Eur Radiol.* 2002;12:858–861.
- [177] Viola A, Chabrol B, Nicoli F, Confort-Gouny S, Viout P, Cozzone PJ. "Magnetic resonance spectroscopy study of glycine pathways in nonketotic hyperglycinemia". *Pediatric Research.* 2002;52:292–300.
- [178] Roda JM, Pascual JM, Carceller F, González-Llanos F, Pérez-Higueras A, Solivera J, Barrios L, Cerdán S. "Nonhistological diagnosis of human cerebral tumors by 1H magnetic resonance spectroscopy and amino acid analysis". *Clin. Cancer Res.* 2000;6:3983–3993.
- [179] Jain S, Wang X, Chang C-C, et al. "Src Inhibition Blocks c-Myc Translation and Glucose Metabolism to Prevent the Development of Breast Cancer." *Cancer Research* 2015;75:4863-4875.
- [180] Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, Woo HK, Jang HG, Jha AK, Chen WW, Barrett FG, Stransky N, Tsun ZY, Cowley GS, Barretina J, Kalaany NY, Hsu PP, Ottina K, Chan AM, Yuan B, Garraway LA, Root DE, Mino-Kenudson M, Brachtel EF, Driggers EM, Sabatini DM (2011) Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 476(7360): 346–350.
- [181] Danielsen ER, Ross B. "Magnetic Resonance Spectroscopy Diagnosis of Neurological Diseases". Marcel Dekker New York 1999;349.
- [182] Wang S, Junliang Y, Xiaojuan G, Peng P, Hua G, Shiqin N, Felipe F, Andrew CN, Wenli H. "Neurochemical correlates of cognitive dysfunction in patients with leukoaraiosis: a proton magnetic resonance spectroscopy study". *Neurological Research* 2012;34:989-997.
- [183] Miller BL, Moats RA, Shonk T, Ernst T, Woolley S, Ross BD. "Alzheimer disease: depiction of increased cerebral myoinositol with proton MR spectroscopy". *Radiology* 1993; 187: 433–37.

- [184] Cheng LL, Chang IW, Louis DN, Gonzalez RG. “Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens”. *J Cancer Res* 1998;58:1825-1832.
- [185] Toker A, Cantley JC. “Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase”. *Nature* 1997;387:673–676.
- [186] Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. “Direct regulation of the AKT protooncogene product by phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate”. *Science* 1997;275:665–668.
- [187] Uhm JH, Dooley NP, Villemure JG, Yong VW. “Glioma invasion in vitro: regulation by matrix metalloprotease-2 and protein kinase C”. *Clin Exp Metastasis*. 1996;14:421-33.
- [188] Binder C, Hagemann T, Husen B, Schulz M, Einspanier A. “Relaxin enhances in-vitro invasiveness of breast cancer cell lines by up-regulation of matrix metalloproteases”. *Mol Hum Reprod*. 2002;8:789-96.
- [189] Kugel H, Heindel W, Ernestus RI, Bunke J, du Mesnil R, Friedmann G. “Human brain tumors: spectral patterns detected with localized H-1 MR spectroscopy”. *Radiology*. 1992;183:701-9.
- [190] Negendank W. G., Sauter R., Brown T. R., Evelhoch J. L., Falini A., Gotsis E. D., Heerschap A., Kamada K., Lee B. C., Mengeot M. M., Moser E., Padavic-Shaller K. A., Sanders J. A., Spraggins T. A., Stillman A. E., Terwey B., Vogl T. J., Wicklow K., Zimmermann R. A. “Proton magnetic resonance spectroscopy in patients with glial tumours: a multicenter study”. *J. Neurosurg* 1996;84:449—458.
- [191] Möller-Hartmann W., Herminghaus S., Marquardt G., Labisch C., Lanfermann H., Zanella F. E. “Differentiation of focal brain lesion by proton magnetic resonance spectroscopy”. 24th Congress ESNR, 1998 in Lissabon, *Neuroradiology* 53.
- [192] Galanaud D, Nicoli F, Chinot O, Confort-Gouny S, Figarella-Branger D, Roche P, Fuentes S, Le Fur Y, Ranjeva JP, Cozzone PJ. “Noninvasive diagnostic assessment of brain tumors using combined in vivo MR imaging and spectroscopy”. *Magn Reson Med* 2006; 556: 1236–1245.

- [193] Herminghaus S, Pilatus U, Möller-Hartmann W, Raab P, Lanfermann H, Schlote W, Zanella FE. “Increased choline levels coincide with enhanced proliferative activity of human neuroepithelial brain tumours”. *NMR Biomed* 2002;15:385—392.
- [194] Majos C, Alonso J, Aguilera C, Serrallonga M, Coll S, Acebes JJ, Arus C, Gili J. “Utility of proton MR spectroscopy in the diagnosis of radiologically atypical intracranial meningiomas”. *Neuroradiology* 2003; 45:129–136.
- [195] Behar KL, Ogino T. “Characterization of macromolecule resonances in the ^1H NMR spectrum of rat brain”, *Magn. Reson. Med.* 1993;30:38–44.
- [196] Behar KL, Rothman DL, Spencer DD, Petroff OA. “Analysis of macromolecule resonances in ^1H NMR spectra of human brain”, *Magn. Reson. Med.* 1994;32: 294–302.
- [197] Jansen JF, Backes WH, Nicolay K, Kooi ME. “ ^1H MR spectroscopy of the brain: absolute quantification of metabolites”. *Radiology* 2006;240:318–332.
- [198] Craveiro M, Clément-Schatlo V, Marino D, Gruetter R, Cudalbu C. “In vivo brain macromolecule signals in healthy and glioblastoma mouse models: ^1H magnetic resonance spectroscopy, post-processing and metabolite quantification at 14.1 T” *J. Neurochem.* 2014;1–10.
- [199] Callies R, Sri-Pathmanathan RM, Ferguson DY, Brindle KM. “The appearance of neutral lipid signals in the ^1H NMR spectra of a myeloma cell line correlates with the induced formation of cytoplasmic lipid droplets”. *Magn Reson Med* 1993; 29:546–550.
- [200] Schlemmer HP, Bachert P, Herfarth KK, Zuna I, Debus J, van Kaick G. “Proton MR spectroscopic evaluation of suspicious brain lesions after stereotactic radiotherapy”. *Am J Neuroradiol.* 2001;22:1316–24.
- [201] Rock JP, Hearshen D, Scarpace L, Croteau D, Gutierrez J, Fisher JL, et al. “Correlations between magnetic resonance spectroscopy and image-guided histopathology, with special attention to radiation necrosis”. *Neurosurgery.* 2002;51:912–9.
- [201] Poptani H, Kaartinen J, Gupta RK, Niemitz M, Hiltunen Y, Kauppinen RA. “Diagnostic assessment of brain tumours and non-neoplastic brain disorders in vivo using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and artificial neural networks”. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1999;125:343–349.

- [203] Szabo de Edelenyi F, Rubin C, Esteve F, Grand S, Decorps M, Lefournier V, Le Bas JF, Remy CA “New approach for analyzing proton magnetic resonance spectroscopic images of brain tumors: nosologic images”. *Nature Medicine* 2000;6:1287–1289.
- [204] Simonetti AW, Melsen W, Van der Graaf M, Postma G, Heerschap A, Buydens LMC. “A chemometric approach for brain tumor classification using magnetic resonance imaging and spectroscopy”. *Analytical Chemistry* 2003;75:5352–5361.
- [205] Di Ieva A, Matula C, Grizzi F, Grabner G, Trattig S, Tschabitscher M. “Fractal analysis of the susceptibility weighted imaging patterns in malignant brain tumors during antiangiogenic treatment: technical report on four cases serially imaged by 7 T magnetic resonance during a period of four weeks”. *World Neurosurg* 2012;77:785.e11–21.
- [206] Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. “Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C → A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene”. *Carcinogenesis* 2001;22:1715–1719.

Објављени научни радови и саопштења у целости/изводу из докторске дисертације:

1. Mihailović Jelena, Daković Marko “Advanced magnetic resonance techniques in early differentiation of pseudo-progression vs. progression in patients with glioblastoma multiforme”. <https://doi.org/10.2298/VSP170114108M>
2. Mihailović Jelena, Grujičić Danica, Lavrnić Slobodan, Daković Marko “The application of local histograms of apparent diffusion coefficient in differentiation of brain astrocytomas”. <https://doi.org/10.2298/VSP161215103M>
3. V. Vukovic, J. Mihailovic, M. Gajic Dobrosavljevic, J. Stevanovic: “Signs of early radiological progression of Glioblastoma multiforme during therapy“, Scientific and Educational Exhibits, European Society of Radiology, Vienna, Austria, 7-11 March, 2013.
4. M. Daković, T. Petrović, J. Mihailović, T. Stošić-Opinčal, G.G. Bačić, D. Grujičić, Diffusion weighted imaging and magnetic resonance spectroscopy in assesment of methylation status of glioblastoma multiforme, Book of abstracts, ESMRMB Congress 2012, p. 401.
5. A. Savić, K. Jovanović, J. Mihailović, K. Radotić, “Fuzzy logic point of view applied to diseases caused by dynamic mutations”, 12th IEEE International Symposium on Computational Intelligence and Informatics, November 21-22, 2011 in Budapest, Hungary.
6. M. Daković, M. Mačvanski-Jovanović, J. Mihailović, S. Lavrnić, D. Grujičić, T. Stošić-Opinčal, ”Application of local ADC histograms in differentiation of brain astrocytoma”, 28th Annual Scientific Meeting, European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology, Leipzig, Germany -6-8 October, 2011.
7. J. Mihailović, A. Savić, J. Bogdanović-Pristov, K. Radotić, “MRI Brain Tumors Images by Using Independent Component Analysis”, 9th IEEE International Symposium on Intelligent Systems and Informatics, Subotica, Serbia 8-10 September, 2011: 433-435.
8. T. S. Opinčal, J. Mihailovic, M. Macvanski, M. Dakovic, “Application of Hierarchical and K-Means Clustering in Analysis of ADC and Kurtosis

values of Brain Tumors”, Program & Abstract Book, XIX Symposium
Neuroradiologicum, The World Congress of Diagnostic & Therapeutic
Neuroradiology, Bologna, Italy 4-9 October, 2010 (Suppl.I): 407-443

9. Биографија

Дипломирани физикохемичар-мастер, Јелена М. Михаиловић рођена је 12.01.1985. Средњу медицинску школу је завршила у Ужицу. Факултет за Физичку хемију, Универзитет у Београду уписала је 2004. године, а завршила 2010. године. Мастер студије на Факултету за Физичку хемију уписала је 2010. године и завршила исте са просечном оценом 10.00. Докторске студије на Факултету за Физичку хемију, смер Биофизичка хемија уписала је 2010. године. Запослена је као здравствени сарадник-физикохемичар на Институту за онкологију и радиологију Србије у служби радиолошке дијагностике. Активно говори енглески, а пасивно се служи шпанским, италијанским.

Током студија учествовала је у једномесечној зимској школи “*Biomolecular Solid-State NMR*” на *ETH* Универзитету у Цириху, Швајцарска (2008) где је и у 2009-ој години била на тромесечној летњој пракси у лабораторији за Физичку хемију у групи *Prof Beat H. Meier*. Освојила је прву награду за најбоље написан рад на тему “*Solid state NMR spectroscopy*”, која се традиционално додељује сваке године у оквиру организоване праксе за стране студенте на *ETH* Универзитету.

Током протеклих година постигла је значајну међународну сарадњу са немачким националним онколошким центром (*German Cancer Research Centre-DKFZ*), Хајделберг, Немачка из области *CEST* спектроскопије током двомесечног боравка у групи *Prof. Mark Ladd-a* и *Prof. Peter Bachert-a*. Такође, сарадња са Клиничко- болничким центром “*Mompia*”, на одељењу Ортопедије и трауматологије Сантандер, Шпанији на раду ултразвучне еластрографије са *dr Luis Perez Carro*.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена Михаиловић

број индекса 303/10

Изјављујем

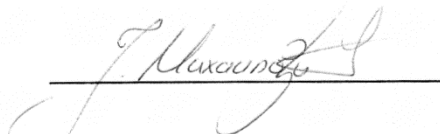
да је докторска дисертација под насловом

Дифузијски наглашено снимање и магнетно-резонантна спектроскопија у
разликовању тумора мозга

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 04.09.2017.



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Јелена Михаиловић _____

Број индекса _303/10 _____

Студијски програм физичка хемија _____

Наслов рада Дифузијски наглашено снимање и магнетно-резонантна
спектроскопија у разликовању тумора мозга _____

Ментор др Марко Даковић _____

Потписани/а Јелена Михаиловић _____

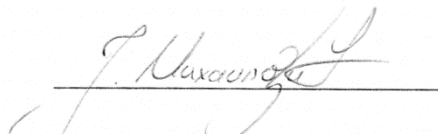
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 04.09.2017.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Дифузијски наглашено снимање и магнетно-резонантна спектроскопија у разликовању тумора мозга

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 04.09.2017.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.