

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

Београд

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Јелене Михаиловић, мастер физикохемичара

На XI редовној седници Наставно-научног већа Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду, одржаној 11.09.2017. године, именовани смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата Јелене Михаиловић, мастер физикохемичара, под насловом:

ДИФУЗИЈСКИ НАГЛАШЕНО СНИМАЊЕ И МАГНЕТНО-РЕЗОНАНТНА СПЕКТРОКОПИЈА У РАЗЛИКОВАЊУ ТУМОРА МОЗГА

На основу прегледа и анализе докторске дисертације кандидата, подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација кандидата мастер физикохемичара Јелене Михаиловић је написана на сто четрдесет четири (144) стране и у складу са *Упутством за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду*. Састоји се из шест главних делова: Увод (2 стране), Циљ рада (1 страна), Материјали и методе (10 страна), Резултати (40 страна), дискусија (16 страна), Закључак (3 страна) и Литература (19 страна – 206 референци). Кандидат је уз текст докторске дисертације приложио следеће: Биографију кандидата (1 страна), Научни допринос кандидата у виду списка радова

проистеклих из докторске дисертације (1 страна), као и додатне прилоге прописане правилима Универзитета о подношењу докторске дисертације на одобравање (4 стране).

Дисертација садржи 56 слика (13 слика из постојеће литературе и 43 слике представљају приказ властитих резултата) и 7 табела са властитим резултатима.

У поглављу *Увод* укратко су описани тематика и актуелност проблематике која је била предмет истраживања, као и циљ истраживања.

У поглављу *Циљ рада* дати су циљеви истраживања.

У поглављу *Теоријске основе* дате су теоријске основе техника дифузијски наглашеног магнетно резонантног снимања (DWI) и *in vivo* магнетно резонантне спектроскопије (MRS), као и техника напредне статистичке и анализе текстуре анализе које су коришћене за анализу МР слика и МР спектра. Поред тога дат је преглед приказа можданих тумора на DWI сликама као и њихових MRS профила, те повезаности DWI и спектроскопских параметара са хистолошких и метаболичким карактеристикама.

У поглављу *Материјали и методе* описани су протоколи аквизиције DWI слика и MR спектра, те одабир пацијената укључених у ретроспективну студију. Поред тога дати су поступци за хистограмску анализу и евалуацију DWI параметара. Описан је и алгоритам анализе MR спектра, укључујући квантификацију метаболита и примену линеарне дискриминане анализе у класификацији спектра можданих тумора,

У поглављу *Резултати* приказани су резултати класификације можданих тумора добијене коришћење класичне, хистограмске и парцијалне хистограмске анализе DWI снимака тумора. Поред тога дати су резултати ових техника на разликовању високоградусних тумора који су настали прогресијом од нискоградусних, од примарних високоградусних тумора. Приказани су резултати класичне и као и напредних техника статистичке анализе MR спектра у разликовању можданих тумора. Класична анализа је примењена и за разликовање прогресије тумора од ефеката терапије на туморско ткиво.

Поглавље *Дискусија* садржи дискусију добијених резултата као и њихово поређење са литературним подацима.

У поглављу *Закључак* сумирани су сви закључци изведени на основу резултата приказаних у докторској дисертацији.

Докторска дисертација завршава поглављем *Литература*, у коме су наведене цитиране референце по редоследу појављивања у тексту.

Б. Опис резултата дисертације

Резултати у оквиру ове дисертације су добијени ретроспективном анализом MR снимака пацијената са можданим туморима код којих је хистопатолошком анализом утврђен градус и тип тумора. Снимци за анализу су, уз сагласност одговарајућег етичког комитета, преузети из базе Одељења за радиолошку онкологију и дијагностику Института за онкологију и радиологију Србије.

Анализа DWI снимака извршена је класичним поступком, где је регион од интереса, на основу T_1 наглашене (T_1W), T_2 наглашене (T_2W) и секвенције са атенуацијом сигнала течности (FLAIR) и уз асистенцију искусног радиолога, пласиран у део тумора који се постконтрастно појачава на T_1 снимцима, едем и некротични део тумора. Анализа ових снимака извршена је и путем хистограмске анализе без и након аутоматске сегментације региона целог тумора. Разлике између параметара добијених анализом DWI снимака су тестиране на статистику значајност помоћу анализе варијанси (ANOVA) са Бонферонијевом корекцијом на вишеструко поређење.

Квалитативна MR спектра вршена је преко утврђивања присуства/одсуства метаболита у спектру, док је семиквантитативна анализа вршена после деконволуције на основу одређивања површина испод резонанција метаболита и њиховог упоређивања са одговарајућом испод резонанције укупног креатина (који се користи као стандард у класичној анализи MR спектра). Поред тога примењена је техника линеарне дискриминантне анализе (LDA) на целим спектрима да би се утврдили региони спектра који се значајно разликују између типова можданих тумора и на основу тога конструисао класификатор за њихову оптималну диференцијацију. Она техника је утврђивање значајних разлика у спектрима рекурентног тумора и ефеката терапије на мождано ткиво.

Класичном анализом DWI снимака – одосно одређивањем привидног дифузионог коефицијента (ADC) у ручно позиционираним регионима интереса (ROI) добијене су вредности овог параметра које не омогућавају диференцијацију тможданих тумора са високом специфичношћу и сензитивношћу. Средње ADC вредности за вијабилни део дифузног астроцитома (WHO градус 2), анапластичног астроцитома (WHO градус 3) и глиобластома мултиформе (WHO градус 4) износиле су $ADC_{sr} = 1246 \pm 193 \cdot 10^{-6}$, $ADC_{sr} = 1027 \pm 206 \cdot 10^{-6}$ и $ADC_{sr} = 986 \pm 274 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ респективно. За перитуморски едем оне су износиле $1595 \pm 245 \cdot 10^{-6}$ (дифузни астроцитом) и $1691 \pm 250 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ (глиобластом), док код анапластичних астроцитома укључених у анализу није запажено присуство едема.

У случају када је позиционирање вршено у регионима за које је на основу хистограмске анализе ADC мапе целог тумора одређено да имају минималне вредности овог параметра, поред средњих вредности одређени су и параметри секунарних хистограма који карактеришу њихово одступање од нормалне расподеле. Показало се да ти параметри, који описују микрокопску хетерогеност тумора у ROI, куртозис фактор K и стандардна девијација ADC параметра омогућавају успешније разликовање градуса тумора. Значајна статистичка разлика нађена је између астроцитома 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 ΔADC , може се уочити да се на основу добијених средњих вредности може разликовати градус 2 од градуса 3 ($p < 0.05$) као и градус 3 од градуса 4 ($p < 0.001$).

Резултати добијени за К указују на сличан тренд као и код ΔADC , на основу чега можемо разликовати само градус 3 и 4 ($p < 0.05$), али не и нискоградусне од високоградусних тумора. Наведено указује да је за успешно разликовање можданих тумора потребно узети у обзир вредности сва три параметра.

Резултати хистограмске анализе извршене након аутоматске сегментације целог региона тумора указују да средња ADC вредност на сегменту који одговара делу тумора са повећаном целуларношћу омогућава успешно разликовање градуса тумора са минималним специфичношћу од 76% и сензитивношћу од 80%. Добијене средње ADC вредности за астроцитоме градуса 2, 3 и 4 су $1185.7 \pm 216.9 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$, $1008.6 \pm 199.3 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$, $8137.8 \pm 126.2 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ редом. Остали параметри хистограма нису омогућили односно у најбољем случају омогућили успешно раздавајање између нискоградусних и високоградусних тумора.

На основу примене линеарне дискриминантне анализе на MR спектрима са кратким ($TE=30 \text{ ms}$) и дугим временом ($TE=135 \text{ ms}$) еха утврђени су региони који показују највеће разлике у облику и интензитету спектра, као и резонантни пикови који припадају тим регионима. Утврђено је да се при $TE=30 \text{ ms}$ статистичке значајне разлике постоје у интензитету пикова миоинозитола (mIno) и глутамин/глутамата (Glx), док су при $TE=135 \text{ ms}$ највеће разлике уочене за глицин (Gly), липиде (Lip) и лактате (Lac). Квантификација mIno, Glx и Gly и накнадна статистичка анализа показала је да се класификатор конструисан на бази интензитета ових пикова може са високом специфичношћу и сензитивношћу искористити за успешну диференцијацију астроцитоме. Коришћењем исте технике показано је да се резонанција глицина може искористити да за успешно разликовање рекурентних тумора од терпијског одговора можданог ткива.

Помоћу фракталне анализе MR снимака показано је да се фрактална димензија контуре постконтрастног појачања значајно разликује за епигенетски различите подтипове глиобластома мултиформе, што омогућује неинвазивну предикцију одговора овог тумора на терапију.

В. Упоредна анализа резултата дисертације са подацима из литературе

Класични MRI представља дијагностичку технику избора за визуелизацију, локализацију и макроскопску карактеризацију можданих тумора. Међутим њихова успешност у диференцирању хистолошких типова и подтипова ових патологија је ограничена, што се може приписати високом хетерогеношћу тумора на микроскопском нивоу. Код дифузијски наглашеног снимања, напредне MRI технике, интензитет сигнала зависи од микроструктурних карактеристика састава ткива, тако да би примена ове технике требало да унапреди разликовање можданих тумора. Међутим основни проблем представља избор региона тумора који ће адекватно репрезентовати најцелуларнији, односно вијабилни део тумора. Најчешће коришћена техника за одређивање ROI је мануелно позиционирање на основу приказа тумора на класичним MR секвенцијама што пак чини анализу субјективном, док њени резултати показују високу варијабилност између студија [Baehring JM et al, *J Neurooncology* 2007; Yamasaki F et al, *Radiology* 2005.].

Вредности привидног дифузионог коефицијента добијене у овој дисертацији коришћењем класичне анализе ADC мапа упоредиве су са вредностима из литературе [Young RJ et al, *J Magn Reson Imaging* 2009; Sugahara T, *J Magn Reson Imaging* 1999; Kono K et al, *AJNR Am J Neuroradiol* 2001; Lam WW, *Clin Radiol* 2002; Bulakbasi N et al, *Am J Neuroradiol* 2003; Higano S, *Radiology* 2006; Kitis O, *Eur J Radiol* 2005; Egelhoff JC, *Am J Neuroradiol* 1992; Holtas S, *Neuroradiology* 2000]. Утврђено је да на основу овако добијеног параметра није могуће разликовати градусе астроцитома, мада су разлике између група нискоградусних тумора биле на граници статистичке значајности. То је у сагласности са једним бројем публикација [Lam WW, *Clin Radiol* 2002].

У овој тези коришћена је хистограмска анализа целог тумора на свим пресецима и у којима се тумор уочава и на основу ње је вршено позиционирање региона од интереса. Резултати су показали да само комбиновање параметара добијених из секундарних хистограма ROI доприноси потпуном разликовању градуса астроцитома. Иако овакав приступ у литератури није описан, добијене вредности за куртозис фактор, средњи ADC и стандардну девијацију на ROI су упоредиве са вредностима добијеним анализом кумулативних хистограма тумора датим у литератури [Kang et al, *Radiology* 2011; Kim et al, *PLOS one*, 2013].

У овој тези по први пут употребљен је алгоритам за анализу ADC мапа који укључује хистограмску анализу након аутоматске сегментације тумора методом кластеризације Ц нејасних граница (*fuzzy C means clustering*). На овај начин читава запремина тумора се сегментира на делове – кластере који одговарају едему, вијабилном и некротичном делу тумора и елиминише субјективност се у анализи ових мапа. На овај начин добијене средње ADC вредности се статистички значајно разликују између градуса астроцитома и на тај начин омогућавају њихову диференцијацију са високом специфичношћу и сензитивношћу. Вредности овог параметра су незнатно ниже него у студијама Young RJ et al, *J Magn Reson Imaging* 2009. и Higano et al., *Radiology* 2006.

Линеарна дискриминатна анализа MR спектра показала је да се значајне разлике у спектрима астроцитома јављају у регионима резонанција mIno и Glx при кратком, те Gly и лактата при кратком времену еха. Слично је регистровано у *in vitro* [Hattingen E et al, *NMR Biomed* 2008; Hattingen E et al, *MAGMA* 2009; Lehnhardt FG, *NMR Biomed.* 2005; Tugnoli V, *Int. J. Mol. Med.* 2005] и MRS студијама [Takano T et al, *Nature Medicine* 2001; Manton DJ et al, *NMR Biomed* 2000; Stadlbauer A, Gruber et al, *Radiology* 2006; Nelson SJ. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 2004; Nelson SJ et al, *NMR in Biomedicine* 1999]. На основу тога је са високом специфичношћу и сензитивношћу, која је упоредива са добијеном у студијама [Manton et al, *NMR Biomed* 2000. и Nagarajan et al, *Neuropharmacology*.2001] разликовати градусе астроцитома.

Фрактална анализа MR снимака је у овој дисертацији по први пут употребљена за успешну диференцијацију подтипова глиобластома мултиформе, који се разликују по реакцији на терапију. По нашем сазнању сличне студије нису описане у литератури.

Г. Научни радови и саопштења публиковани из резултата дисертације

Кандидат Јелена Михаиловић из резултата дисертације има 2 рада прихваћена за публикавање у научним часописима међународног значаја на којима је први аутор (за које је добијен DOI број), једно саопштење са конференција штампано у целини, као и 3 саопштења у зборницима међународних научних скупова:

М23 – Рад у међународном часопису

1. Mihailović J. and Daković M., „Advanced magnetic resonance techniques in early differentiation of pseudo-progression vs. progression in patients with glioblastoma multiforme”, *Vojnosanitetski pregled*, DOI: <http://doi.org/10.2298/VSP170114108M>
2. Mihailović J., Grujičić D., Lavrić S. and Daković M. „The application of local histograms of apparent diffusion coefficient in differentiation of brain astrocytoma” *Vojnosanitetski pregled*, <http://doi.org/10.2298/VSP161215103M>.

М33 – Саопштење са међународног скупа штампано у целини

1. Mihailović J, Savić A., Bogdanović-Pristov J., Radotić K, MRI brain tumors images by using independent component analysis, 2011 IEEE 9th International Symposium on Intelligent Systems and Informatics • September 8-10, 2011, Subotica, Serbia, 433-435.

М34 – Саопштење са међународног скупа штампано у изводу

1. Stosic-Opincal T., Mihajlovic J., Macvanski, M., Dakovic M, Application of Hierarchical and K-Means Clustering in Analysis of ADC and Kurtosis Values of Brain Tumors , XIX Symposium Neuroradiologicum, Bologna, 2010, *The Neuroradiology Journal* 23 (Suppl. 1) p 424-425.
2. Daković M., Petrović T., Mihailović J., Stošić-Opinčal T., Bačić G.G., Grujičić D., Diffusion weighted imaging and magnetic resonance spectroscopy in assesment of methylation status of glioblastoma multiforme, Book of abstracts, ESMRMB Congress 2012, p. 401.
3. Vuković V., Mihailović, J., Gajić-Dobrosavljević J., Stevanović J., Signs of early radiological progression of glioblastoma multiforme, European Congress of Radiology, Wien 2013, <http://doi.org/10.1594/ecr2013/C-1063>

Д. Закључак Комисије

На основу изложеног може се закључити да резултати кандидата мастер физикохемичара Јелене Михаиловић, приказани у овој докторској дисертацији представљају значајан научни допринос области физичке хемије, нарочито биофизичке хемије. Практичан допринос резултата је тезе у примени нових техника у анализи MR снимака и спектра које омогућавају неинвазивну диференцијације можданих тумора са високом специфичношћу и сензитивношћу. То за резултат може имати смањивање

потребе за преоперативним инвазивним процедурама за одређивањем хистолошког градуса ових тумора.

Део резултата из дисертације кандидата је публикован у 2 (два) рада у међународним часописима, једног саопштења са међународних скупова штампаног у целини, као и у виду саопштења у зборницима апстраката међународних научних скупова (3 саопштења).

На основу изложеног, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију мастер физикохемичара Јелене Михаиловић под насловом:

„ДИФУЗИЈСКИ НАГЛАШЕНО СНИМАЊЕ И МАГНЕТНО-РЕЗОНАНТНА
СПЕКТРОКОПИЈА У РАЗЛИКОВАЊУ ТУМОРА МОЗГА“

и предлаже Наставно-научном већу Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду да прихвати и одобри њену јавну одбрану, чиме би били испуњени сви услови да кандидат стекне звање *доктор физичкохемијских наука*.

У Београду, 26.10.2017.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

др Марко Даковић, доцент
Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

др Катарина Качар, научни сарадник
Медицински факултет, Универзитет у Београду

др Милош Мојовић, ванредни професор
Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду