



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Wykorzystanie wielowymiarowych technik analizy widm 1H MRS in vivo w różnicowaniu wrodzonych wad metabolizmu

Author: Agnieszka Skorupa

Citation style: Skorupa Agnieszka. (2016). Wykorzystanie wielowymiarowych technik analizy widm 1H MRS in vivo w różnicowaniu wrodzonych wad metabolizmu. Praca doktorska. Katowice: Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIWERSYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Uniwersytet Śląski
Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii
Instytut Fizyki im. A. Chełkowskiego

**Wykorzystanie wielowymiarowych technik analizy
widm ^1H MRS *in vivo* w różnicowaniu wrodzonych
wad metabolizmu**

Agnieszka Skorupa

Praca doktorska
wykonana w Centrum Onkologii –
Instytucie im. Marii Skłodowskiej – Curie
Oddział w Gliwicach

Promotor: Prof. dr hab. Maria Sokół

Gliwice 2016

Podziękowania

Pragnę podziękować wszystkim osobom, dzięki którym mogłam zrealizować niniejszą pracę.

Przede wszystkim dziękuję pani Promotor - prof. dr hab. Marii Sokół za ogromną cierpliwość i szereg cennych uwag.

Szczególne podziękowania składam również dr hab. Ewie Jamroz, dr Justynie Paprockiej oraz dr Magdalenie Wicher.

Spis treści

Spis treści	3
Skróty	4
1 Cykl publikacji będący podstawą rozprawy doktorskiej.....	5
2 Zastosowanie techniki ^1H MRS <i>in vivo</i> w diagnostyce chorób ośrodkowego układu nerwowego	8
2.1 Spektroskopia rezonansu magnetycznego.....	8
2.2 Techniki lokalizacyjne w spektroskopii ^1H MRS <i>in vivo</i>	9
2.3 Neurometabolity oceniane przy pomocy techniki ^1H MRS <i>in vivo</i>	10
2.4 Oprogramowanie LCModel	13
3 Zastosowanie metod rozpoznawania wzorców w analizie widm MRS <i>in vivo</i>	16
4 Technika ^1H MRS <i>in vivo</i> jako narzędzie wykorzystywane w diagnostyce i monitorowaniu terapii wrodzonych błędów metabolizmu.....	19
4.1 Wrodzone błędy metabolizmu	19
4.2 MRI i MRS w badaniach wrodzonych błędów metabolizmu	21
4.3 Zastosowanie metod rozpoznawania wzorców w różnicowaniu wrodzonych błędów metabolizmu	23
5 Cel pracy	25
6 Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach A.1, A.2, A.3	26
6.1 Publikacja A.1	26
6.2 Publikacja A.2	28
6.3 Publikacja A.3	31
7 Podsumowanie	33
8 Tekst publikacji A.1.....	34
9 Tekst publikacji A.2.....	41
10 Tekst publikacji A.3.....	56
11 Załącznik: Zastosowanie metody ^1H MRS <i>in vivo</i> oraz wielowymiarowych technik analizy danych w ocenie niejednorodności metabolicznej mózgowia.....	68
11.1 Wstęp	68
11.2 Materiały i metody	68
11.2.1 Grupa badana	68
11.2.2 Badania ^1H MRS <i>in vivo</i>	69
11.2.3 Analiza danych ^1H MRS <i>in vivo</i>	70
11.2.4 Analiza wielowymiarowa.....	72
11.3 Wyniki.....	76
11.3.1 Analiza jednowymiarowa.....	76
11.3.2 Analiza wielowymiarowa.....	79
11.4 Dyskusja.....	90
11.5 Podsumowanie	93
12 Piśmiennictwo.....	94

Skróty

Cho	związki cholinowe
BG	<i>Basal Ganglia</i> , jądra podstawne
Cre	Kreatyna + fosfokreatyna
CSF	<i>Cerebrospinal Fluid</i> , płyn mózgowo - rdzeniowy
CSI	<i>Chemical Shift Imaging</i> , obrazowanie przesunięcia chemicznego
CV	<i>Cerebellar Vermis</i> , robak mózdzku
FGM	<i>Frontal Grey Matter</i> , czołowa istota szara
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i> , szerokość połówkowa
FWM	<i>Frontal White Matter</i> , czołowa istota biała
Gln	glutamina
Glu	glutaminian
Glx	glutaminian + glutamina
GM	<i>Grey Matter</i> , istota szara
H	<i>Hippocampus</i> , hipokamp
Ins	Mio-inozytol
Lip	lipidy
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i> , obrazowanie rezonansu magnetycznego
MRS	<i>Magnetic Resonance Spectroscopy</i> , spektroskopia rezonansu magnetycznego
NAA	N-acetylo-asparaginian
NAAG	N-acetylo-aspartylo-glutaminian
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , jądrowy rezonans magnetyczny
OGM	<i>Occipital Grey Matter</i> , potyliczna istota szara
OWM	<i>Occipital White Matter</i> , potyliczna istota biała
P	<i>Pons</i> , most
PCA	<i>Principal component analysis</i> , analiza głównych składowych,
PLS-DA	<i>Partial least squares – discriminant analysis</i> , analiza cząstkowych najmniejszych kwadratów – analiza dyskryminacyjna
PRESS	<i>Point Resolved Spectroscopy</i>
SNR	<i>Signal to Noise Ratio</i> , stosunek sygnału do szumu
SV	<i>Single Voxel</i> , pojedynczy woxel
T	<i>Thalamus</i> , wzgórze
TE	<i>echo time</i> , czas echa
tNAA	NAA+NAAG
TR	<i>repetition time</i> , czas repetycji
WM	<i>White Matter</i> , istota biała

1 Cykl publikacji będący podstawą rozprawy doktorskiej

Niniejsza rozprawa doktorska oparta jest na cyklu trzech publikacji na temat: **"Wykorzystanie wielowymiarowych technik analizy widm ^1H MRS *in vivo* w różnicowaniu wrodzonych wad metabolizmu"**:

A.1 Polnik Agnieszka (Skorupa Agnieszka), Sokół Maria, Jamroz Ewa, Paprocka Justyna, Wicher Magdalena, Banasik Tomasz, Marszał Elżbieta, Kiełtyka Aleksandra, Konopka Marek. Contribution of ^1H MRS to differential diagnosis of neurologic disorders in children. W: Some aspects of medical physics - *in vivo* and *in vitro* studies. Red. Z. Drzazga, K. Śłosarek, Polish Journal of Environmental Studies. Series of Monographs. Vol.1, 2010, str. 27-33. Rozdział w książce wydanej w Polsce, punktacja MNiSW: 5 punktów.

A.2 Skorupa Agnieszka, Jamroz Ewa, Paprocka Justyna, Sokół Maria, Wicher Magdalena Kiełtyka Aleksandra. Bridging the gap between metabolic profile determination and visualization in neurometabolic disorders: a multivariate analysis of proton magnetic resonance *in vivo* spectra. J Chemometrics. 2013;27:76–90. Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 1.803, punktacja MNiSW: 30 punktów.

A.3 Skorupa Agnieszka, Wicher Magdalena, Banasik Tomasz, Jamroz Ewa, Paprocka Justyna, Kiełtyka Aleksandra, Sokół Maria, Konopka Marek. Four-and-one-half years' experience in monitoring of reproducibility of an MR spectroscopy system-application of *in vitro* results to interpretation of *in vivo* data. J Appl Clin Med Phys. 2014;15(3):4754. Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 1.172, punktacja MNiSW: 20 punktów.

Uzupełnieniem wyników przedstawionych w wyżej wymienionych publikacjach jest zastosowanie metody ^1H MRS *in vivo* oraz wielowymiarowych technik analizy danych w ocenie niejednorodności metabolicznej mózgowia (wyniki przygotowywane do publikacji, przedstawione w załączniku niniejszej pracy doktorskiej).

Tematyka pracy doktorskiej jest również związana z innymi publikacjami, nie wchodzącymi w skład wyżej wymienionego cyklu publikacji:

B.1 Staniszewski Michał, Bińczyk Franciszek, **Skorupa Agnieszka**, Boguszewicz Łukasz, Sokół Maria, Polańska Joanna, Polański Andrzej. Comparison of Black Box Implementations of Two Algorithms of Processing of NMR Spectra, Gaussian Mixture Model and Singular Value Decomposition. W: Proceedings of the International Conference on Bio-inspired Systems and Signal Processing. Red. Harald Loose, Ana Fred, Hugo Gamboa and Dirk Elias. BIOSIGNALS 2015, str. 57-65.

B.2 **Skorupa Agnieszka**, Jamroz Ewa, Paprocka Justyna, Sokół Maria, Wicher Magdalena, Kiełtyka Aleksandra, Boguszewicz Łukasz. Diagnostic utility of ^1H MRS in various neurological disorders in children – a pattern recognition approach. W: Proceedings of Data Acquisition and Evaluation Methods in Proton MR Spectroscopy 2010. Red. U. Klose, Shaker Verlag 2011, str. 54-62.

B.3 **Skorupa Agnieszka**, Wicher Magdalena, Banasik Tomasz, Kiełtyka Aleksandra, Sokół Maria. Evaluation of the long-term reproducibility of an MRS system – a phantom study. W: Proceedings of Data Acquisition and Evaluation Methods in Proton MR Spectroscopy 2010. Red. U. Klose, Shaker Verlag 2011, str. 29-35.

B.4 Emich-Widera Ewa, Sokół Maria, **Polnik Agnieszka (Skorupa Agnieszka)**, Kazek Beata, Wicher Magdalena. ^1H -MRS in children and adolescents with good response and intractable epilepsy. W: Some aspects of medical physics - in vivo and in vitro studies. Red. Z. Drzazga, K. Ślosarek. Polish Journal of Environmental Studies. Series of Monographs. Vol.1, 2010, str. 22-26

B.5 **Polnik Agnieszka (Skorupa Agnieszka)**, Wicher Magdalena, Banasik Tomasz, Kiełtyka Aleksandra, Konopka Marek, Sokół Maria, Jamroz Ewa, Paprocka Justyna. Dimensionality Reduction Based Classification of Proton Magnetic Resonance in vivo Spectra from the Normal Human Brain. W: WC 2009, IFMBE Proceedings 25/IV, Editors: O. Dössel, W. C. Schlegel, 2009, Springer, Berlin, pp. 2333-2337.

B.6 Polnik Agnieszka (Skorupa Agnieszka), Boguszewicz Łukasz, Cichoń Anna, Sokół Maria. Wykorzystanie wielowymiarowych technik eksploracji danych w analizie widm ^1H MRS in vivo. W: Inżynieria Wiedzy I Systemy Ekspertowe, część IV, Pod redakcją: A. Grzech, K. Juszczyzyn, H. Kwaśnicka, N.T. Nguyen. Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, 2009, Warszawa 2009, str. 487-497.

B.7 Boguszewicz Łukasz, Sokół Maria, Polnik Agnieszka (Skorupa Agnieszka), Maciejowski Maciej. Metabonomics based on pattern recognition methods in ^1H in vivo MRS in differentiation metabolic profiles of multiple sclerosis subtypes. W: WC 2009, IFMBE Proceedings 25/IV, Editors: O. Dössel, W. C. Schlegel, 2009, Springer, Berlin, pp.1498–1501.

B.8 Boguszewicz Łukasz, Sokół Maria, Polnik Agnieszka (Skorupa Agnieszka), Cichoń Anna, Białecki Ryszard. Zastosowanie metod rozpoznawania wzorca do rozróżnienia widm ^1H MRS in vivo osób palących i niepalących papierosy. W: Inżynieria Wiedzy I Systemy Ekspertowe, część IV, Pod redakcją: A. Grzech, K. Juszczyzyn, H. Kwaśnicka, N.T. Nguyen. Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2009, str. 475-485.

2 Zastosowanie techniki ^1H MRS *in vivo* w diagnostyce chorób ośrodkowego układu nerwowego

2.1 Spektroskopia rezonansu magnetycznego

Zjawisko jądrowego rezonansu magnetycznego zostało zaobserwowane niezależnie przez Feliksa Blocha i Edwarda Purcella w 1945 roku [1,2].

Jądra atomowe charakteryzujące się nieparzystą liczbą protonów i neutronów oraz jądra o parzystej liczbie nukleonów jednego rodzaju i nieparzystej liczbie nukleonów drugiego rodzaju posiadają wewnętrzny moment pędu zwany spinem jądrowym. W zewnętrznym polu magnetycznym następuje przestrzenne kwantowanie spinu i związane z tym kwantowanie energii. Przejścia między jądrowymi poziomami energetycznymi mogą być indukowane przez absorpcję promieniowania elektromagnetycznego o częstotliwości odpowiadającej różnicy energii tych poziomów. Ponieważ różnica ta zależy od otoczenia chemicznego jądra (zjawisko przesunięcia chemicznego), rejestracja promieniowania elektromagnetycznego emitowanego na skutek procesów powrotu układu spinów do stanu równowagi termodynamicznej (zjawiska relaksacji) dostarcza informacji o strukturze i właściwościach cząsteczek. Technika analityczną opartą na zjawisku przesunięcia chemicznego jest spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR, ang. *Nuclear Magnetic Resonance*), a klinicznym odpowiednikiem tej metody jest spektroskopia rezonansu magnetycznego (MRS, ang. *Magnetic Resonance Spectroscopy*) *in vivo* stanowiąca cenne źródło informacji biochemicznej uzyskiwanej w nieinwazyjny sposób.

Chociaż metoda MRS może wykorzystywać takie nuklidy jak ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{23}Na i ^{31}P , wysoki współczynnik żyromagnetyczny i duża abundancja naturalna izotopu wodoru ^1H sprawiają, że technika ^1H MRS *in vivo* jest podstawową metodą spektroskopową oferowaną przez większość producentów nowoczesnych skanerów MRI (ang. *Magnetic Resonance Imaging*). Należy podkreślić, że metoda ta nie wymaga rozszerzenia sprzętowego skanera MRI (np. badanie spektroskopowe wykonuje się przy użyciu cewek radiowych stosowanych w badaniach obrazowych), a jedynie sekwencji lokalizacyjnych pozwalających zdefiniować obszar pomiarowy. W technikach obrazowych źródłem sygnału NMR są protony wody i tłuszczu, zaś w technikach spektroskopowych najbardziej interesujące z diagnostycznego punktu widzenia są

sygnały pochodzące od protonów związków chemicznych uczestniczących w procesach metabolicznych, tzw. metabolitów.

2.2 Techniki lokalizacyjne w spektroskopii ^1H MRS *in vivo*

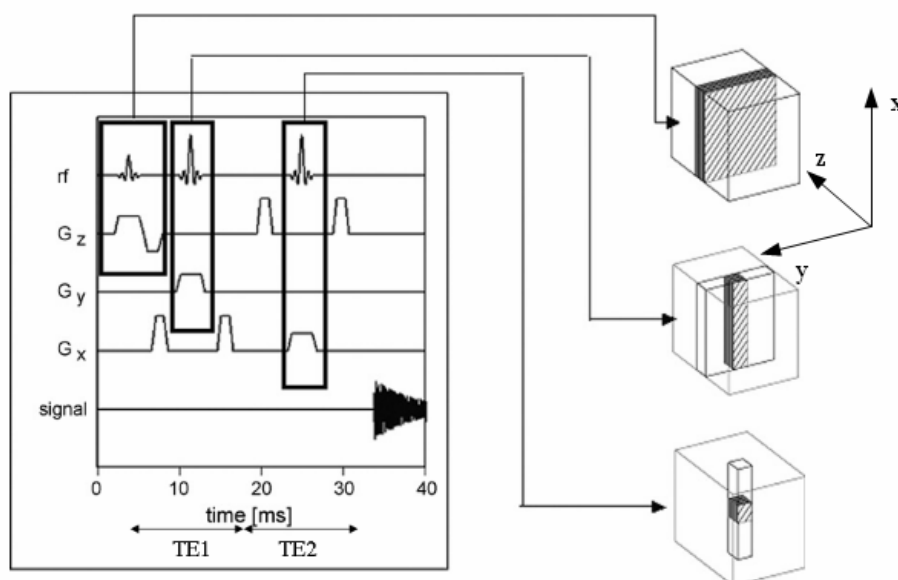
Badanie ^1H MRS *in vivo* jest zwykle poprzedzone akwizycją obrazu MRI, na podstawie którego planowane jest położenie obszaru pomiarowego.

Spektroskopowe techniki lokalizacyjne dzielą się na metody pojedynczego woksela (ang. *single voxel*, SV) polegające na rejestracji widma ^1H MRS *in vivo* z pojedynczego obszaru zainteresowania oraz metody obrazowania przesunięcia chemicznego (ang. *chemical shift imaging*, CSI), które dają możliwość akwizycji widm z wielu obszarów jednocześnie. Widma rejestrowane przy użyciu metody SV charakteryzują się lepszą jakością ze względu na większą efektywność optymalizacji pola magnetycznego dla małych objętości pomiarowych (ok. $4\text{-}10\text{ cm}^3$) niż w przypadku techniki CSI, w której obszar pomiarowy jest znacznie większy. Zaletą drugiej metody jest natomiast możliwość przestrzennej oceny procesów metabolicznych.

W niniejszej pracy została wykorzystana sekwencja lokalizacyjna SV PRESS (ang. *Point Resolved Spectroscopy*), a rysunek 1 przedstawia schemat tej sekwencji [3]. Zastosowanie impulsu częstotliwości radiowej 90° skojarzonego z gradientem stałego pola magnetycznego w kierunku z (G_z) prowadzi do powstania składowej poprzecznej wektora magnetyzacji w płaszczyźnie xy. Ze względu na występujące niejednorodności pola magnetycznego i wzajemne oddziaływania między spinami jądrowymi dochodzi do utraty spójności fazy precesji spinów, w wyniku czego wektor magnetyzacji poprzecznej zanika. Zastosowanie impulsu 180° skojarzonego z gradientem stałego pola magnetycznego w kierunku y (G_y) po czasie $TE_{1/2}$ od impulsu 90° przywraca spójność fazy precesji spinów jądrowych w elemencie objętości na przecięciu warstw xy i xz. Sygnał echa spinowego, który jest generowany po czasie TE_1 , nie jest rejestrowany. Zastosowanie kolejnego impulsu 180° po czasie $TE_1+TE_2/2$ wraz z gradientem G_x wzbudzającym warstwę w płaszczyźnie yz ostatecznie definiuje objętość pomiarową jako objętość na przecięciu warstw xy, xz i yz. Po czasie $TE = TE_1+TE_2$ generowany i rejestrowany jest sygnał właściwego echa spinowego. Czas między impulsem 90° a właściwym sygnałem echa spinowego określa się czasem echa (ang. *echo time*, TE), a

czas między kolejnymi impulsami 90° jest nazywany czasem repetycji (ang. *repetition time*, TR).

Modyfikacja pasma częstotliwości impulsów oraz wartości centralnej tego pasma pozwala na zmianę objętości obszaru zainteresowania oraz jego dowolną lokalizację względem izocentrum skanera. Zmieniając natomiast TE można dokonać filtracji występujących w widmie sygnałów metabolitów ze względu na czas relaksacji poprzecznej (T2). Stopień relaksacji podłużnej (T1) dla grup funkcyjnych metabolitów można modyfikować przez zmianę TR. W związku z tym, że tkankowe stężenia metabolitów są o wiele niższe od stężenia wody w tkankach, sekwencje pomiarowe umożliwiają tłumienie sygnału wody. Nietłumiony sygnał wody jest także rejestrowany w celu przeprowadzenia korekcji prądów wirowych i/lub normalizacji intensywności sygnału MRS uzyskanego z tłumieniem wody.



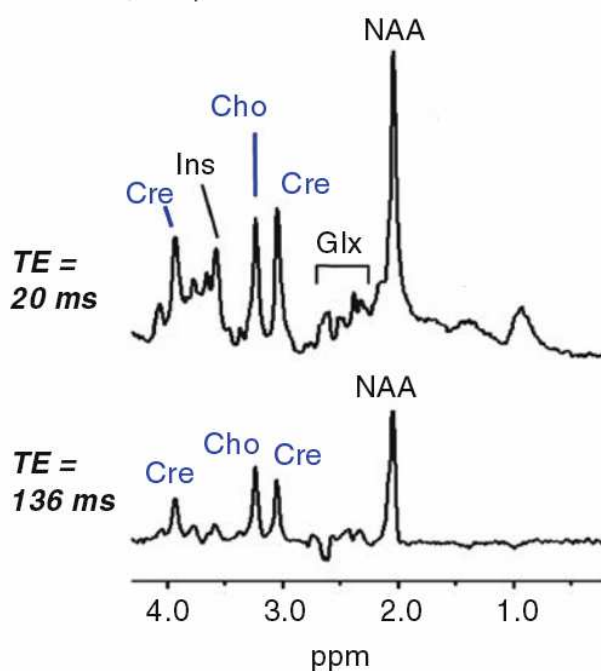
Rysunek 1. Sekwencja lokalizacyjna PRESS [3].

2.3 Neurometabolity oceniane przy pomocy techniki ^1H MRS *in vivo*

Technika ^1H MRS *in vivo* dostarcza informacji o niskocząsteczkowych metabolitach o stężeniach 0,5-15 mM charakteryzujących się odpowiednią mobilnością.

Zawartość informacyjna widm ^1H MRS *in vivo* zależy od parametrów akwizycji (np. TE, TR), indukcji pola magnetycznego oraz techniki lokalizacyjnej. Podstawowymi sygnałami obserwowanymi w widmie ^1H MRS zdrowego mózgu są: pik grupy

acetylowej N-acetylo-asparagianinu (NAA) przy 2,02 ppm [częściowo nałożony z pikiem grupy acetylowej N-acetylo-aspartylo-glutaminianu (NAAG) przy 2,05 ppm], sygnał grupy metylowej kreatyny/fosfokreatyny (Cre) przy 3,03 ppm oraz sygnał grup metylowych związków zawierających cholinę (Cho) przy 3,21 ppm (reprezentujący glicerofosfocholinę, fosfocholinę oraz wolną cholinę). Metabolity te widoczne są w widmach rejestrowanych zarówno dla krótkiego TE (< 35 ms), jak i dla długiego TE (> 80 ms). W widmach ^1H MRS *in vivo* mierzonych dla krótkiego TE obserwuje się dodatkowo metabolity o krótkich czasach relaksacji poprzecznej (np. pik grup metinowych mio-inozytolu [Ins] przy 3,56 ppm, pasmo w zakresie 2,1 – 2,5 ppm pochodzące od grup metylenowych glutaminianu i glutaminy [Glu+Gln oznaczane jako Glx]) oraz szerokie sygnały związków lipidowych i makrocząsteczek, które wnoszą wkład do linii bazowej sygnału MRS. Rysunek 2 przedstawia przykładowe widma ^1H MRS *in vivo* zarejestrowane dla krótkiego oraz długiego TE.



Rysunek 2. Przykładowe widma ^1H MRS *in vivo* zarejestrowane dla krótkiego oraz długiego TE.

W tabeli 1 zamieszczona jest krótka charakterystyka najważniejszych metabolitów ocenianych na skanerach klinicznych (1,5 i 3T) [4].

Metabolit	Charakterystyka metabolitu
N-acetylo-asparaginian (NAA)	<ul style="list-style-type: none"> • NAA jest syntezowany w mitochondriach neuronów, dyfunduje wzdłuż aksonów, rozkładany w oligodendrocytach. • Marker uszkodzenia neuronów (ich gęstości i funkcji). • Główne źródło grup acetylowych do syntezy lipidów. • Prekursor NAAG, osmolit.
Kreatyna/fosfokreatyna (Cre)	<ul style="list-style-type: none"> • Kreatyna jest syntezowana w wątrobie i transportowana do mózgu, gdzie bierze udział w reakcji Lohmanna: ATP + kreatyna → ADP + fosfokreatyna, • Związana z procesami bioenergetycznymi. • Sygnał kreatyny/fosfokreatyny przy 3.01 ppm jest często traktowany jako standard wewnętrzny.
Związki zawierające cholinę (Cho)	<ul style="list-style-type: none"> • Związki cholinowe uczestniczą w procesach syntezy i rozpadu błon komórkowych, • Są markerami strukturalnej integralności błon komórkowych (osłonki mielinowej). • Odzwierciedlają intensywność proliferacji komórkowej.
Mio-inozytol (Ins)	<ul style="list-style-type: none"> • Mio-inozytol to marker astrocytów. • Uczestniczy w metabolizmie fosfatydyloinozytolu. • Zmiany stężenia odzwierciedlają zmiany metabolizmu błon komórkowych, produkt rozpadu mieliny. • Bierze udział w przekaźnictwie wewnątrzkomórkowym. • Osmolit.
Glutaminian i glutamina (Glu+Gln = Glx)	<ul style="list-style-type: none"> • Na skanerach klinicznych 1,5 lub 3 T zwykle wyznacza się sumę sygnałów tych metabolitów, którą oznacza się jako Glx. • Glutaminian należy do najważniejszych neuroprzekaźników pobudzających. W trakcie pobudzenia neuronów glutaminian jest uwalniany do przestrzeni synaptycznej i wychwytywany przez astrocyty, w których jest przekształcany w glutaminę. • Powstała z glutaminianu glutamina jest kierowana do neuronów, w których wchodzi w cykl przemian prowadzących do powstania glutaminianu.
Lipidy (Lip)	<ul style="list-style-type: none"> • W widmie zdrowego mózgu niska intensywność sygnału tych związków jest związana z ograniczoną ruchliwością cząsteczek związków lipidowych unieruchomionych w błonach komórkowych. • Wzrost intensywności sygnału tych metabolitów świadczy o uszkodzeniu błon komórkowych, martwicy.

Tabela 1. Charakterystyka najważniejszych metabolitów rejestrowanych w widmach ^1H MRS *in vivo* na skanerach klinicznych.

Procesy patologiczne mogą znaleźć swoje odzwierciedlenie w widmach ^1H MRS *in vivo* poprzez zaburzenie intensywności sygnałów typowych dla normostanu (wzrost/redukcja intensywności, ewentualnie zanik sygnału), a także poprzez

pojawienie się dodatkowych sygnałów (np. mleczan [5], bursztynian [6], arabitol i rybitol [7]). Rejestracja widm dla długiego TE jest przydatna w ocenie takich metabolitów jak mleczan i glicyna, które nakładają się z sygnałami lipidów i mioinozytolu w widmach mierzonych dla krótkiego TE, ale charakteryzują się dłuższymi czasami relaksacji poprzecznej.

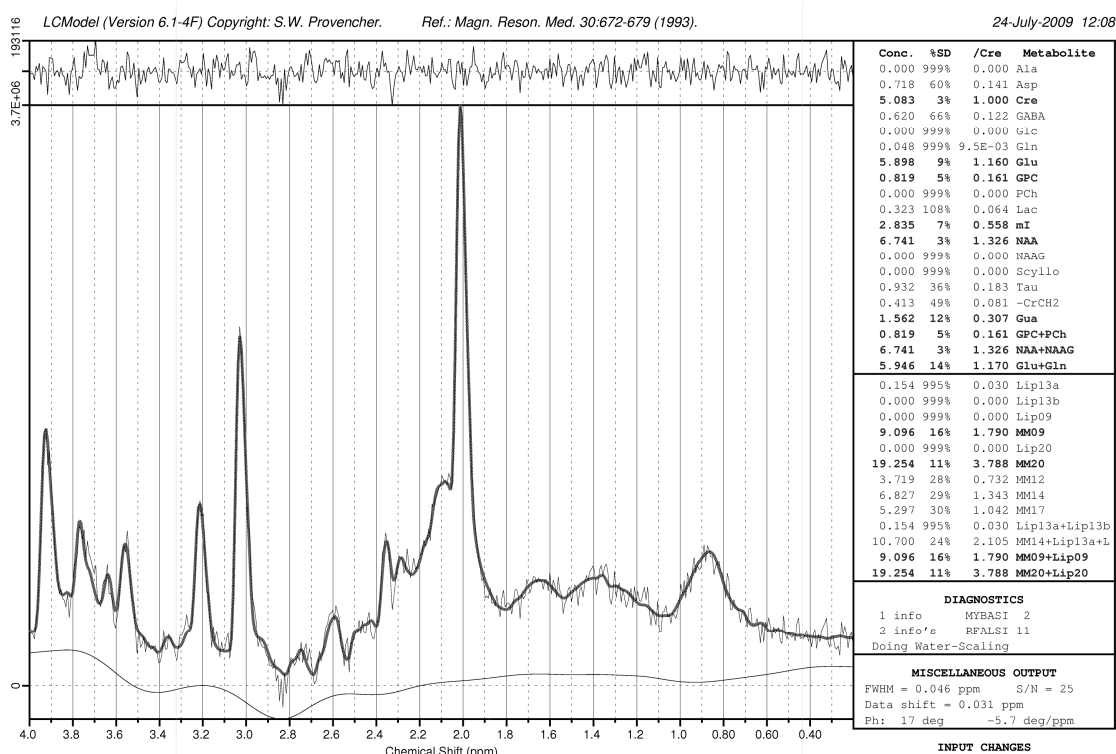
Teoretycznie, wzrost indukcji pola magnetycznego z 1,5 T do 3 T powinien wiązać się z 2-krotnym wzrostem stosunku sygnału do szumu oraz rozdzielczości spektralnej. W praktyce jednak, nie obserwuje się tak znacznej poprawy jakości widm. Badania porównawcze wskazują, że procentowa różnica stosunku sygnału do szumu widm zmierzonych przy rozważanych indukcjach pola magnetycznego wynosi tylko 20-50 % [8]. Można to wytłumaczyć zmianami czasów relaksacji (wzrost T1 i spadek T2) oraz mniejszą efektywnością optymalizacji jednorodności pola magnetycznego dla pola magnetycznego o indukcji 3T w porównaniu z polem 1,5T. Biorąc pod uwagę rozdzielczość spektralną, efekty związane z podwojeniem różnicy częstotliwości rezonansowych poszczególnych metabolitów (wyrażonej w Hz) są częściowo kompensowane wzrostem szerokości połówkowych dla wyższej indukcji pola magnetycznego.

W związku z coraz częstszym pojawianiem się w zastosowaniach medycznych skanerów, w których stosowane są pola o indukcji przekraczającej standardowe wartości (1,5 – 3 T), oraz rozwojem specjalistycznych sekwencji pomiarowych liczba metabolitów ocenianych przy pomocy techniki ^1H MRS *in vivo* zwiększyła się z ok. 5-6 (1,5 – 3 T) do 14 (7 T) [9].

2.4 Oprogramowanie LCModel

Analiza widm ^1H MRS *in vivo* w dziedzinie częstotliwości polega na wstępnej obróbce sygnału (m.in. transformacja Fouriera, korekcja prądów wirowych, korekcja fazy, korekcja linii bazowej) oraz wyznaczeniu integralnych intensywności pików odpowiadających poszczególnym metabolitom. W związku z tym, że zakres przesunięć chemicznych związków ocenianych przy użyciu techniki ^1H MRS *in vivo* jest wąski (ok. 8 ppm), analiza ta jest szczególnie utrudniona dla widm rejestrowanych dla krótkiego TE, w których obserwuje się nakładanie sygnałów różnych metabolitów oraz skomplikowaną linię bazową.

Oprogramowanie LCModel (ang. *Linear Combination of Model Spectra*) umożliwia automatyczną analizę widm ^1H MRS przy założeniu, że widmo zarejestrowane w warunkach *in vivo* jest kombinacją liniową widm poszczególnych metabolitów, lipidów i makrocząsteczek zasymulowanych lub zmierzonych w warunkach *in vitro* (tzw. zestaw bazowy) [10]. Główną zaletą tej metody jest wykorzystanie w analizie pełnego i rzeczywistego widma ^1H MRS danego metabolitu zamiast niezależnego dopasowywania pików reprezentujących różne grupy chemiczne danego metabolitu [11]. Współczynniki kombinacji liniowej odzwierciedlające poziomy metabolitów wyznaczone są równocześnie z położeniami linii rezonansowych, ich szerokościami połówkowymi, korekcją fazy oraz linii bazowej. Przykładowy wynik takiej analizy przedstawiony jest na rysunku 3. Rysunek ten przedstawia zmierzone widmo, dopasowane widmo, linię bazową oraz wartości reszt (różnic między wartościami uzyskanymi z dopasowania a wartościami zmierzonymi, po korekcji linii bazowej). Rezultat dopasowania przedstawiony jest także w postaci liczbowej, jako zestaw stężeń metabolitów, ich proporcji względem kreatyny oraz niepewności oszacowania stężeń.



Rysunek 3. Wynik analizy widma ^1H MRS *in vivo* przeprowadzonej przy użyciu oprogramowania LCModel.

Chociaż w praktyce klinicznej najczęściej ocenia się wzajemne proporcje metabolitów, oprogramowanie LCModel pozwala wyznaczyć stężenia bezwzględne

przy pomocy metody standardu wewnętrznego lub zewnętrznego [12]. Jako standard wewnętrzny wykorzystuje się sygnał nietłumionego piku wody zarejestrowany z tej samej objętości pomiarowej, z której rejestrowane było właściwe widmo ^1H MRS *in vivo* zmierzone z tłumieniem wody. W metodzie tej wyeliminowany zostaje wpływ czynników związanych z niejednorodnością zmiennego pola magnetycznego B1, zmiennością załadowania cewki oraz niestabilnością pracy skanera MRI [13]. Dokładność wyznaczonych stężeń zależy głównie od poprawności przyjętych założeń dotyczących czasów relaksacji oraz stężenia wody w objętości pomiarowej. Chociaż parametry te są znane dla zdrowego mózgu [14,15], dokładne ich określenie w warunkach patologicznych wymaga przeprowadzenia ilościowego obrazowania MRI [16]. Akwizycja widm przy krótkim czasie echa ($\text{TE} < 35$ ms) oraz długim czasie repetycji ($\text{TR} > 5000$ ms) pozwala zminimalizować błędy związane z niepewnościami czasów relaksacji. Jednak, w praktyce klinicznej pomiary ^1H MRS *in vivo* przeprowadza się w warunkach niepełnej relaksacji. W metodzie standardu zewnętrznego natomiast stężenia metabolitów mózgowych wyznaczane są na podstawie niezależnego pomiaru widma z fantomu o znanym składzie. Stosując tę technikę należy oszacować (i ewentualnie skorygować) wpływ niejednorodności pola B1, przeprowadzić korekcję zmiennego załadowania cewki pomiarowej oraz kontrolować stabilność pracy skanera MRI [13].

3 Zastosowanie metod rozpoznawania wzorców w analizie widm MRS *in vivo*

Pierwsze badania metabolizmu mózgu w warunkach *in vivo* z wykorzystaniem zjawiska rezonansu magnetycznego zostały przeprowadzone już w latach 70 ubiegłego wieku [17]. Od tego czasu udowodniono wysoką przydatność techniki ^1H MRS *in vivo* w diagnostyce wielu schorzeń, na przykład takich jak: guzy mózgu [18], padaczka [19], czy wrodzone wady metabolizmu [6]. Mimo to, technika ta nadal nie jest rutynowo stosowana w praktyce klinicznej, głównie ze względu na konieczność czasochłonnej analizy danych wymagającej specjalistycznej wiedzy. Niewątpliwie duże znaczenie w popularyzacji metody w środowiskach medycznych ma wsparcie bioinformatyczne, w tym przede wszystkim dostęp do narzędzi automatycznej lub semi-automatycznej obróbki i analizy widm (takich jak LCMoDel). Jednak, wyniki uzyskane z użyciem różnych metod bazujących na wiedzy podanej *a priori* (np. pozycje pików, parametry ograniczające szerokości połówkowe, model linii bazowej, kształt pików itd.) nie zawsze są zgodne [20].

Już w latach 90. ubiegłego wieku Howells i wp. wykazali na przykładzie widm ^{31}P MRS *in vivo* zarejestrowanych z guzów, że dekompozycja sygnału MRS i wyznaczenie integralnych intensywności sygnałów odpowiadających poszczególnym metabolitom nie zawsze są konieczne, aby uzyskać klinicznie istotną informację [21]. Zastosowanie metod rozpoznawania wzorców otwiera możliwość automatyzacji procesu wyznaczania przydatnych diagnostycznie cech widm. Pierwsze prace oparte były na zastosowaniu analizy dyskryminacyjnej oraz sztucznych sieci neuronowych [22]. Analizie wielowymiarowej poddawano zarówno pełne nierozdzielne widma, jak również: znormalizowane poziomy metabolitów wyznaczone metodą prostego obliczania pól powierzchni pod pikami w określonych granicach przesunięć chemicznych, poziomy metabolitów wyznaczone drogą dopasowania sygnałów rezonansowych, proporcje metabolitów, zmienne otrzymane na podstawie takich transformacji jak analiza głównych składowych, analiza niezależnych składowych i transformacja falkowa [23, 24].

Wynikiem międzynarodowej współpracy wielu ośrodków w ramach projektu INTERPRET (1999-2002) był prototypowy system wspomaganie diagnostyki służący do klasyfikacji guzów mózgu [25]. Pomimo zamknięcia projektu, prace nad nim są

nadal kontynuowane [26]. W swoim zamierzeniu system miał ułatwiać radiologom korzystanie z informacji o metabolizmie guza w praktyce klinicznej. W pierwszej fazie skupiono się na wizualizacji rozrzutu profili metabolicznych guzów złośliwych i łagodnych w dwuwymiarowej przestrzeni cech spektralnych wyznaczonych przy pomocy analizy dyskryminacyjnej. Klasyfikacja nowych przypadków przeprowadzana była przez automatyczne „umieszczenie” ocenianego widma w wyżej wymienionej przestrzeni oraz ocenę odległości diagnozowanego przypadku od środków ciężkości skupień opowiadających rozpatrywanym typom guzów. Obecna wersja systemu (INTERPET v.3.1) oprócz możliwości klasyfikacji najczęściej występujących guzów pozwala rozróżniać guzy mózgu od innych zmian (np. stwardnienie rozsiane) oraz gglejaki wielopostaciowe od przerzutów nowotworów do mózgu [27,28].

Do głównych osiągnięć twórców projektu należy zaliczyć: stworzenie bazy kilkuset widm guzów mózgu ze znanym rozpoznaniem histopatologicznym, standaryzację protokołów akwizycji widm rejestrowanych w różnych ośrodkach, opracowanie metody konwersji widm zmierzonych na różnych skanerach MRI do wspólnego formatu, opracowanie szczegółowych protokołów kontroli jakości, określenie optymalnych metod przetwarzania wstępnego widm, ekstrakcji cech spektralnych oraz wyboru klasyfikatorów w rozważanych problemach klasyfikacyjnych [26,29,30]. Ważnym osiągnięciem jest także stworzenie oprogramowania SpectraClassifier umożliwiającego opracowywanie klasyfikatorów z wykorzystaniem analizy głównych składowych oraz liniowej analizy dyskryminacyjnej [31].

Autorzy dwóch kolejnych projektów finansowanych przez Unię Europejską: e-Tumour [32] (2004-2009) i HalhAgents [33] (2006-2008), korzystali z baz danych oraz wyników projektu INTERPET. Z kolei zbiór widm zarejestrowanych w ramach projektu e-Tumour został wykorzystany w procesach walidacji modeli opracowanych przez twórców projektu INTERPET [34]. W związku z tym, że zbiory uczący i testowy widm otrzymane zostały w różnych ośrodkach badawczych oraz w różnych okresach czasowych, eksperyment ten udowodnił dużą zdolność predykcyjną opracowanych modeli oraz potwierdził możliwość wykorzystywania systemów skonstruowanych w jednym ośrodku przez użytkowników z innych ośrodków. Chociaż za pomocą metod rozpoznawania wzorców można wykazać różnice w widmach w zależności od stosowanego typu skanera, to użycie odpowiednich technik klasyfikacyjnych pozwala na wyeliminowanie wpływu czynników aparaturowych stowarzyszonych z protokołami akwizycji [35]. Co więcej, przy pewnych problemach klasyfikacyjnych (rozróżnienie

guzów złośliwych od łagodnych) widma zarejestrowane przy indukcji pola 1,5 T okazały się kompatybilne z widmami otrzymanymi przy 3T [36].

4 Technika ^1H MRS *in vivo* jako narzędzie wykorzystywane w diagnostyce i monitorowaniu terapii wrodzonych błędów metabolizmu

4.1 Wrodzone błędy metabolizmu

Wrodzone błędy metabolizmu stanowią liczną (powyżej 600) grupę schorzeń genetycznych związanych głównie z defektami enzymatycznymi. Chociaż poszczególne jednostki chorobowe należą do schorzeń rzadkich (większość występuje z częstotliwością niższą niż 1:100 000 urodzeń), szacuje się, że globalnie występują one z częstotliwością ok. 1:784 urodzeń, stanowiąc znaczący odsetek stanów chorobowych stwierdzanych u dzieci [37]. W związku z tym, że większość wrodzonych błędów metabolizmu jest dziedziczonych w sposób autosomalny recesywny, najwyższą częstotliwość ich występowania obserwuje się w lokalnych populacjach o dużym stopniu pokrewieństwa (np. 1:400 urodzeń w Turcji [38]). Badania epidemiologiczne wskazują jednak, że schorzenia te mogą występować sporadycznie niezależnie od etnicznych czy geograficznych uwarunkowań.

Zaburzenia aktywności enzymu na pewnym etapie szlaku metabolicznego mogą skutkować brakiem powstawania prawidłowych metabolitów lub gromadzeniem nieprawidłowych związków o toksycznym działaniu. Działanie to może być bezpośrednie (np. podwyższenie stężenia amoniaku w surowicy krwi prowadzi do obrzęku mózgu w przebiegu hiperamonemii) lub pośrednie (np. inhibicja enzymów przez nieprawidłowy związek lub aktywacja alternatywnych szlaków metabolicznych) [39].

Wrodzone wady metabolizmu klasyfikuje się ze względu na [40]:

- Narząd dotknięty zaburzeniami: choroby niezwiązane z dysfunkcją ośrodkowego układu nerwowego (np. choroby spichrzeniowe glikogenu), choroby związane z zaburzeniami wyłącznie w ośrodkowym układzie nerwowym (np. choroba Canavan – zwyrodnienie gąbczaste układu nerwowego lub leukodystrofia gąbczasta) oraz choroby związane zarówno z zaburzeniami ośrodkowego układu nerwowego, jak i innych narządów (np. mukopolisacharydoza)

- Organelle komórkowe, których funkcja jest zaburzona: choroby mitochondrialne (np. MELAS, MERRF), peroksysomalne (np. adrenoleukodystrofia sprzężona z chromosomem X, zespół Zellwegera), lizosomalne (np. leukodystrofia metachromatyczna, choroba Krabbeego)
- Zaburzenia przemiany biochemicznej takich związków jak: aminokwasy (np. choroba syropu klonowego, tyrozynergia), kwasy organiczne (np. choroba Canavan), węglowodany (np. galaktozemia) i metale (np. choroba Wilsona).

Choroby metaboliczne ośrodkowego układu nerwowego można podzielić ze względu na zajęcie: istoty białej, istoty szarej lub obu rodzajów tkanek [39] .

Schorzenia przebiegające z zajęciem głównie istoty białej określa się terminem *leukodystrofie*. Jest to grupa chorób niejednorodna pod względem występujących deficytów biochemicznych oraz organelli komórkowych, których funkcja jest zaburzona. Zalicza się do niej np. leukodystrofię metachromatyczną, chorobę Krabbeego, chorobę Canavan. W niektórych schorzeniach zaklasyfikowanych do leukodystrofii defekt metaboliczny nie jest znany (np. w leukoencefalopatii z wielkogłowieciem i obecnością torbieli podkorowych).

W chorobach metabolicznych istoty białej podstawowe zaburzenia dotyczą zwykle przemian biochemicznych mieliny – substancji wytwarzanej przez oligodendrocyty, z której zbudowana jest otoczka wokół aksonów spełniająca ważną rolę w procesie przewodzenia impulsów nerwowych. Nieprawidłowe związki biochemiczne tworzące się w przebiegu chorób metabolicznych mogą powodować zaburzenia procesu mielinizacji układu nerwowego, który rozpoczyna się w życiu płodowym i kończy w trzeciej dekadzie życia. Wyróżnia się kilka procesów patologicznych związanych z chorobami mieliny: *demielinizację* (proces rozpadu uprzednio prawidłowo wytworzonej mieliny spowodowany selektywnym pierwotnym zajęciem osłonki mielinowej albo oligodendrogleju), *dysmielinizację* (proces prowadzący do powstania nieprawidłowej pod względem strukturalnym i funkcjonalnym mieliny) oraz *hypomielinizację* (proces, w których mielina tworzy się w niewystarczającej ilości). W niektórych chorobach metabolicznych mamy do czynienia z postępującym obniżeniem gęstości istoty białej, co może być wynikiem wakuolizacji mieliny lub powstawania cyst. Chociaż w leukodystrofiach obserwuje się głównie zaburzenia istoty białej, istota szara też jest często objęta procesami patologicznymi (np. w chorobie Canvan czy Krabbeego).

Przykładem chorób metabolicznych zajmujących przede wszystkim istotę szarą są choroby mitochondrialne. W przebiegu tych schorzeń zmiany w substancji białej również mogą być obserwowane.

Do końca 2013 r. w Polsce wdrożono badania przesiewowe noworodków w kierunku 23 chorób wrodzonych (obejmujących schorzenia metaboliczne i endokrynologiczne), a program Ministra Zdrowia na lata 2015-2018 przewiduje zwiększenie tej liczby [41]. W diagnostyce tych rzadkich schorzeń wykorzystuje się badania rutynowe oraz specjalistyczne [w tym takie jak: chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią masową, (*Gas chromatography–mass spectrometry*, GC-MS), wysokosprawna chromatografia cieczowa, (*high-performance liquid chromatography*, HPLC), czy tandemowa spektrometria mas (MS/MS)], badania laboratoryjne płynów ustrojowych, badania histologiczne tkanek (np. nerwów obwodowych, mózgu, mięśni, skóry) oraz badania obrazowe. W wielu wrodzonych wadach metabolizmu objawy kliniczne nie występują w pierwszych miesiącach życia. Niektóre schorzenia ujawniają się nagle i odznaczają się ostrym przebiegiem, tak jak na przykład niedobór dehydrogenazy acylokoenzymu A średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. *Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*, MCAD), a inne stopniowo prowadzą do ciężkich powikłań (np. fenyloketonuria). Niespecyficzność objawów oraz różnorodność postaci klinicznych chorób metabolicznych (częsty brak korelacji między genotypem a fenotypem) sprawia, że schorzenia te stanowią wyzwanie diagnostyczne dla klinicystów. Wciąż poszukiwane są nowe metody diagnostyczne mające ułatwić ich rozpoznawanie i klasyfikację. Wczesna diagnoza ma kluczowe znaczenie, ponieważ niekiedy istnieje możliwość terapii (np. choroba Wilsona, deficyt metylotransferazy guanidyno-octanowej czy fenyloketonuria). Prawidłowe rozpoznanie choroby jest również ważne z punktu widzenia poradnictwa genetycznego w rodzinach, w których wystąpił defekt enzymatyczny.

4.2 MRI i MRS w badaniach wrodzonych błędów metabolizmu

Technika MRI wykazuje wysoką czułość w detekcji zmian występujących w ośrodkowym układzie nerwowym u pacjentów cierpiących na wrodzone wady metabolizmu, ale różnorodne procesy patologiczne (takie jak: demielinizacja, obrzęk, dysmielinizacja) charakteryzują się nieswoistym obniżeniem sygnału na obrazach T1-zależnych oraz podwyższeniem sygnału na obrazach T2-zależnych. Jednak, przydatność

techniki MRI wynika głównie z możliwości oceny lokalizacyjnych wzorców zmian w ośrodkowym układzie nerwowym [42]. Specyficzne zapotrzebowanie energetyczne i odżywcze różnych struktur mózgowych (np. istota biała, jądra podstawne) w funkcji wieku ma duży wpływ na selektywną podatność tych struktur na uszkodzenia związane z różnymi postaciami chorób metabolicznych (postać noworodkowa, młodzieńcza). Lokalizacyjne wzorce zmian mogą być typowe dla danego schorzenia (np. choroba Canavan), sugerujące diagnozę (np. kwasica metylomalonowa) lub niespecyficzne [40].

Rozpoznawanie wzorców zmian na obrazach MRI może być połączone z oceną profili metabolicznych. Van der Voorn i wsp. wykazali, że stężenia metabolitów rejestrowanych przy pomocy techniki ^1H MRS *in vivo* mogą istotnie ułatwiać różnicowanie procesów patologicznych istoty białej [43]. W przypadku pewnych schorzeń metabolicznych technika ta ma kluczowe znaczenie w diagnostyce i monitorowaniu terapii. Brak sygnału kreatyny w widmach ^1H MRS *in vivo* mózgu wskazuje na zespół niedoboru kreatyny [44-46], a zmiana sygnału tego metabolitu w widmie w trakcie jego doustnej suplementacji pozwala różnicować defekty syntezy (wzrost piku kreatyny w trakcie terapii) od defektu transportera (brak odpowiedzi na terapię w widmie ^1H MRS *in vivo*). Wzrost sygnału NAA związany niewydolnością asparatoacylazy (hydrolizującej NAA do octanu i asparagianu) jest natomiast charakterystyczny dla choroby Canavan [47]. Warto jednak zaznaczyć, że podwyższony sygnał tego metabolitu został również zarejestrowany w chorobie Pelizaeusa-Merzbachera, w której ubytek mieliny w istocie białej powoduje zwiększenie gęstości aksonów w objętości pomiarowej [48]. Technika ^1H MRS *in vivo* przyczyniła się do odkrycia wrodzonych wad metabolizmu polioli. Widma mózgu zarejestrowane u pacjenta z leukoencefalopatią o nieznannej etiologii wykazały podwyższenie arabitolu i rybitolu [7].

Do innych schorzeń, w których defekt metaboliczny jest bezpośrednio odzwierciedlony w widmach ^1H MRS, należą jeszcze między innymi: choroba syropu klonowego (podwyższenie piku odpowiadającego rozgałęzionym aminokwasom i alfa-ketokwasom przy 0,9 ppm), nieketotyczna hiperglicynemia (wzrost piku grupy metylenowej glicyny przy 3,55 ppm), fenyloketonuria (wzrost intensywności sygnału protonów metinowych fenyloalaniny przy 7,36 ppm) i deficyt dehydrogenazy bursztynianowej (wzrost intensywności sygnału grup metylenowych bursztynianu przy 2,4 ppm) [6].

Względnie niska czułość i rozdzielczość widmowa techniki ^1H MRS *in vivo* utrudniają jednak różnicowanie wielu błędów metabolizmu. Liczba metabolitów ocenianych tą metodą jest stosunkowo niewielka w porównaniu z liczbą metabolitów znajdujących w płynie mózgowo-rdzeniowym (ok. 480) przy użyciu różnych metod pomiarowych [49]. Związki widoczne w widmach ^1H MRS biorą udział w wielu wzajemnie ze sobą powiązanych szlakach metabolicznych [4], co powoduje, że rejestrowane zmiany profilu biochemicznego są często są niespecyficzne (np. obniżenie sygnału NAA w leukodystrofiach o różnorodnej etiologii). Jednocześnie, w niektórych chorobach, zaburzenia metabolizmu neuronów (odpowiadające zmianom NAA) towarzyszą nieprawidłowościom w metabolizmie mieliny (odzwierciedlonym w zmianach Cho) czy glejozie (widocznej na podstawie poziomu Ins). Wydaje się, że zastosowanie wielowymiarowych metod rozpoznawania wzorców (analiza głównych składowych, PCA, czy metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów - analiza dyskryminacyjna, PLS-DA) opartych na analizie związków między metabolitami (korelacjach, kowariancjach) może ułatwić różnicowanie wrodzonych wad metabolizmu. Techniki te mogą być cennym uzupełnieniem metod opartych na jednowymiarowych miarach tendencji centralnej i rozproszenia rozkładu stężeń metabolitów.

4.3 Zastosowanie metod rozpoznawania wzorców w różnicowaniu wrodzonych błędów metabolizmu

Chociaż systemy komputerowego wspomaganie decyzji w oparciu o technikę ^1H MRS *in vivo* dotyczyły głównie klasyfikacji guzów mózgu, w piśmiennictwie można znaleźć kilka publikacji potwierdzających przydatność wielowymiarowych technik rozpoznawania wzorców w różnicowaniu wrodzonych błędów metabolizmu.

Pierwsza próba zastosowania metod rozpoznawania wzorców u dzieci z neurologicznymi chorobami metabolicznymi została opisana w pracy poświęconej klasyfikacji widm pochodzących od pacjentów cierpiących na choroby lizosomalne, peroksosomalne i osób zdrowych [50]. Autorzy wykazali przydatność analizy głównych składowych w wizualizacji różnic międzygrupowych oraz zgodność wniosków uzyskanych na podstawie nienadzorowanej analizy z obserwacjami klinicznymi. Podkreślona została rola analiz wielowymiarowych w monitorowaniu przebiegu choroby poszczególnych pacjentów jako alternatywa dla metod klasycznych. Podobnie,

w [51] wykazano przydatność analizy dyskryminacyjnej w rozróżnieniu stopnia zaawansowania adrenoleukodystrofii związanej z chromosomem X. Analizę dyskryminacyjną wykorzystano również w klasyfikacji podstawowych procesów patologicznych istoty białej [52]. W wymienionych pracach analizowanymi cechami widm były znormalizowane integralne intensywności metabolitów.

5 Cel pracy

Podstawowym celem niniejszej pracy było określenie skuteczności techniki ^1H MRS *in vivo* i metod wielowymiarowych jako narzędzi wspomagających diagnostykę chorób neurologicznych u dzieci.

Cele szczegółowe obejmowały wizualizację głównych trendów zmienności w widmach ^1H MRS *in vivo* zarejestrowanych z istoty białej mózgu w niejednorodnej grupie pacjentów (u których zdiagnozowano zarówno wrodzone błędy metabolizmu, jak i inne często występujące choroby neurologiczne) oraz wskazanie schorzeń metabolicznych, które mogą być odróżnione od innych chorób na podstawie nienadzorowanych analiz wielowymiarowych.

Ze względu na potrzebę automatyzacji analizy danych spektroskopowych, w pracy podjęto próbę konstrukcji modeli matematycznych zarówno w oparciu o poziomy metabolitów wyznaczone z użyciem oprogramowania LCModel, jak i na podstawie pełnych nierozdzielonych widm. W pracy uwzględniono także kwestie związane z potrzebą kontroli jakości pracy skanera MRI. Zaproponowano wykorzystanie nienadzorowanej metody wykrywania niestabilności pracy skanera MRI w ilościowej analizie widm ^1H MRS *in vivo* rejestrowanych na przestrzeni kilku lat.

W związku z coraz szerszym wykorzystaniem technik rozpoznawania wzorców w ocenie procesów patologicznych, celem uzupełniającym niniejszej pracy była wielowymiarowa analiza metabolicznej niejednorodności anatomicznej mózgowia u zdrowych ochotników.

6 Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach A.1, A.2, A.3

W publikacjach A.1 i A.2 podjęto problem redukcji wymiaru danych zarejestrowanych z użyciem techniki ^1H MRS *in vivo* w celu wizualizacji różnic biochemicznych między rzadkimi wrodzonymi błędami metabolizmu a innymi często występującymi schorzeniami neurologicznymi u dzieci. Grupę badaną stanowili pacjenci Oddziału Pediatrii i Neurologii Wieku Rozwojowego (Górnośląskie Centrum Zdrowia Dziecka im. Jana Pawła II w Katowicach) skierowani na badania MRI i ^1H MRS *in vivo* w latach 2006-2009 z podejrzeniem wrodzonych wad metabolizmu.

W związku z niską częstotliwością występowania poszczególnych schorzeń metabolicznych, w wymienionych publikacjach wykorzystano nienadzorowaną analizę głównych składowych (PCA). Metoda ta pozwala na transformację zmiennych wejściowych w nowe, wzajemnie ortogonalne zmienne (główne składowe) uporządkowane według ilości wyjaśnianej wariancji w zbiorze danych. Techniczne aspekty ilościowej oceny poziomów metabolitów w widmach ^1H MRS *in vivo* rejestrowanych na przestrzeni kilku lat opisano w publikacji A.3.

6.1 Publikacja A.1

W publikacji A.1 przedstawiona jest interpretacja geometryczna metody PCA wraz z omówieniem sposobu analizy wykresów wartości czynnikowych (ang. *scores plot*) oraz ładunków czynnikowych (ang. *loadings plot*).

W publikacji tej opisano wyniki uzyskane dla 55 pacjentów, wśród których rozpoznano 7 przypadków wrodzonych wad metabolizmu (2 przypadki choroby Canavan, 3 przypadki leukodystrofii metachromatycznej, 2 przypadki leukoencefalopatii z wielkogłowiem i obecnością torbieli podkorowych [choroby van der Knaap]) oraz 4 przypadki leukodystrofii o nieznannej etiologii. W tabeli 2 przedstawiono krótką charakterystykę tych schorzeń. U pozostałych pacjentów zdiagnozowano: mózgowo porażenie dziecięce, encefalopatie padaczkowe oraz opóźnienie rozwoju. Widma ^1H MRS *in vivo* (TE = 35 ms, TR = 1500 ms) rejestrowano z obszarów zainteresowania zawierających głównie istotę białą. Widma ^1H MRS *in vivo* dla długiego TE (144 ms) były rejestrowane w celu detekcji mleczanu, ale nie były poddanej szczegółowej analizie.

Diagnoza, pierwotna klasyfikacja schorzenia	Defekt metaboliczny	Publikacja A.1	Publikacja A.2
Leukodystrofia metachromatyczna, Schorzenie lizosomalne Leukodystrofia	Obniżenie aktywności arylosulfatazy A prowadzące do gromadzenia m.in. siarczanów galaktocerebrozydu – sulfatydów w komórkach układu nerwowego, co skutkuje postępującą demielinizacją.	✓	✓
Choroba Canavan, Leukodystrofia	Deficyt aspartoacylazy, brak możliwości rozkładu NAA do octanu i asparagianinu, gromadzenie NAA w tkance mózgowej, surowicy krwi i moczu.	✓	✓
Leukoencefalopatia z wielkogłowiem i obecnością torbieli podkorowych (choroba van der Knaap) Leukodystrofia	Nieznany deficyt metaboliczny, zmniejszenie gęstości istoty białej, obrzęk i wakuolizacja mieliny.	✓	✓
Globoidalna leukodystrofia, Schorzenie lizosomalne	Obniżenie aktywności β -galaktozydazy galaktocerebrozydu, prowadzące do gromadzenia galaktozylosfingozyny (psychozyny) i galaktozyloceramidu wywołujących demielinizację układu nerwowego.		✓
Nieketotyczna hyperglicynemia, Zaburzenie przemiany aminokwasów	Defekt enzymu związanego z katabolizmem glicyny, gromadzenie glicyny w układzie nerwowym, krwi i moczu.		✓
Wrodzone zaburzenia glikozylacji	Zaburzenia glikozylacji białek lub lipidów, nieprawidłowości w funkcjonowaniu wielu narządów (m.in. ośrodkowego układu nerwowego)		✓
Encefalopatia etylomalonowa	Zaburzenia powstawania enzymu ETHE1, zaburzenia procesów energetycznych, powstawanie toksycznego kwasu etylomalonowego i mleczanu.		✓
Cytopatie mitochondrialne	Zaburzenia funkcjonowania mitochondriów (upośledzenia procesów metabolicznych łańcucha oddechowego), zajęcie narządów o intensywnym metabolizmie mitochondrialnym (m.in. ośrodkowego układu nerwowego).		✓

Tabela 2. Charakterystyka wrodzonych błędów metabolizmu analizowanych w publikacjach A.1 i A.2

Cechami widm analizowanymi przy użyciu metody PCA były stężenia metabolitów wyznaczone z wykorzystaniem oprogramowania LCMModel metodą skalowania do nietłumionego sygnału wody. Redukcja wymiaru danych pozwoliła na wizualizację zależności między rzadkimi chorobami metabolicznymi a innymi schorzeniami neurologicznymi w 3-wymiarowym układzie współrzędnych głównych składowych, będących kombinacjami liniowymi wejściowych stężeń metabolitów. Główny kierunek wariancji (PC1) w analizowanym zestawie danych związany był z obniżeniem poziomów ocenianych metabolitów w chorobie van der Knaap, co można wytłumaczyć zmniejszeniem gęstości istoty białej i wzrostem mózgowego stężenia wody w tym schorzeniu. Druga główna składowa (PC2) była natomiast przydatna w odróżnieniu choroby Canavan od leukodystrofii metachromatycznej. Wyższe poziomy NAA (oraz NAA+NAAG) i niższy poziom związków cholinowych w chorobie Canavan niż w leukodystrofii metachromatycznej były odpowiedzialne za uzyskane rozdzielanie. Dwa przypadki leukodystrofii metachromatycznej oraz pacjenci ze zdiagnozowaną chorobą Canavan odznaczają się też wysokim poziomem Ins, którego zmienność jest reprezentowana przez trzecią główną składową (PC3). Poziom Ins dla trzeciego przypadku leukodystrofii metachromatycznej jest zdecydowanie niższy niż dla pozostałych pacjentów cierpiących na tę samą chorobę, zaś poziom Cho – wyższy, co potwierdza różnorodność wewnątrzgrupową profili metabolicznych obserwowanych dla danych wad metabolizmu. Analiza wykazała także nakładanie się obszaru grupującego leukodystrofię o nieznannej etiologii z obszarami typowymi dla innych schorzeń neurologicznych w 3-wymiarowej przestrzeni głównych składowych.

6.2 Publikacja A.2

W publikacji A.1 wykazano, że obniżenie poziomów metabolitów w chorobie van der Knaap jest największym źródłem wariancji w analizowanym zestawie danych oraz cechą odróżniającą to schorzenie od pozostałych. Jednak, zróżnicowanie wartości ładunków czynnikowych poszczególnych metabolitów dla pierwszej głównej składowej wskazuje, że w chorobie tej występują także zaburzenia proporcji metabolitów. Wykorzystanie różnych metod normalizacji widm ^1H MRS *in vivo* dostarcza uzupełniających informacji pozwalających na lepszy wgląd w procesy patologiczne. Często wymienianym przykładem schorzenia, w którym interpretacja widm może zależeć od metody normalizacji jest również choroba Canavan. Jej cechy: gąbczaste

zmiany tkanki mózgowej, zwiększenie stężenia wody oraz redukcja gęstości neuronów, powodują, że w niektórych pracach nie stwierdzono w tej chorobie wzrostu poziomu NAA (wyrażonego w mmol/cm^3 czy w mmol/g mokrej masy tkanki mózgowej) mimo znacznych zmian proporcji NAA względem Cho czy Cre [53]. Dlatego w publikacji A.2 zastosowano dwie alternatywne metody normalizacji widm ^1H MRS *in vivo*.

Dzięki prowadzonym równolegle z badaniami ^1H MRS *in vivo* wieloletnimi testami kontroli stabilności skanera MRI, możliwe było zastąpienie metody skalowania do nietłumionego sygnału wody (stosowanej w publikacji A.1) metodą standardu zewnętrznego. Pozwoliło to uniknąć wpływu zmian stężenia oraz właściwości relaksacyjnych wody na interpretację wyników. Chociaż w większości opublikowanych prac rozpatrywane były proporcje metabolitów do kreatyny, van der Voorn i wsp. wykazali, że stężenie kreatyny jest istotnym parametrem różnicującym procesy patologiczne w chorobach istoty białej [43]. Ta ważna obserwacja jednocześnie dyskwalifikuje ten metabolit jako standard wewnętrzny. W metodzie normalizacji stosowanej w publikacji A.2 jako czynnik skalujący wykorzystano więc sumę intensywności integralnych najważniejszych metabolitów, unikając wskazywania konkretnego związku jako wzorca.

Grupy pacjentów opisane w publikacjach A.1 i A.2 częściowo się pokrywają. Do wrodzonych wad metabolizmu opisanych w publikacji A.2 włączono dodatkowo pojedyncze przypadki leukodystrofii globoidalnej, nieketotycznej hiperglicynemii, encefalopatii etylomalonowej oraz 3 przypadki cytopatii mitochondrialnych. W tabeli 2 przedstawiono krótką charakterystykę tych schorzeń.

Analiza PCA stężeń metabolitów wyznaczonych z użyciem oprogramowania LCModel przedstawiona w publikacji A.1 okazała się skuteczna w wizualizacji zmian metabolicznych w klasycznych leukodystrofiach. W publikacji A.2 podjęto problem wykorzystania tej metody w analizie „surowych” nierozdzielonych widm. Wyniki uzyskane z wielowymiarowej analizy nie wymagającej podania *a priori* informacji o zestawie bazowym metabolitów porównano z wynikami uzyskanymi z wykorzystaniem oprogramowania LCModel (przed i po przeprowadzeniu korekcji ze względu na zmienność metabolitów związaną z dojrzewaniem układu nerwowego w przedziale wiekowym od 2 do 52 miesięcy).

Analiza PCA nierozdzielonych widm znormalizowanych metodą standardu zewnętrznego potwierdziła obniżenie intensywności profilu metabolicznego w chorobie van der Knaap jako główne źródło zmienności (reprezentowane przez pierwszą główną

składową, PC1) w analizowanym zbiorze danych. Druga składowa (PC2) odzwierciedla zarówno podwyższenie produktów rozpadu mieliny (związków cholinowych i Ins), jak i uszkodzenie neuronów (obniżenie poziomu NAA) w rozpatrywanych schorzeniach lizosomalnych (leukodystrofii metachromatycznej i globoidalnej). W związku z tym, że składowa ta wyjaśnia zmienność zarówno związków cholinowych, jak i Ins, na płaszczyźnie dwóch pierwszych składowych modelu nie obserwuje się wewnątrzgrupowej niejednorodności profili metabolicznych w leukodystrofii metachromatycznej, która była widoczna w analizie jednowymiarowej. Tę niejednorodność można dostrzec jednak na płaszczyźnie drugiej i trzeciej (PC2-PC3) oraz drugiej i czwartej głównej składowej (PC2-PC4). Płaszczyzny te są także przydatne w odróżnieniu choroby Canavan od pozostałych schorzeń metabolicznych oraz innych chorób neurologicznych. Wysoki poziom NAA i Ins oraz niski poziom związków cholinowych i Cre są cechami charakterystycznymi dla tego schorzenia.

Zastosowanie sumy intensywności integralnych najważniejszych metabolitów jako czynnika normalizującego widma ^1H MRS *in vivo* pozwoliło na wyeliminowanie obniżenia profilu metabolicznego w chorobie van der Knaap jako największego źródła wariacji w analizowanym zestawie danych. Pierwsza składowa (PC1) modelu skonstruowanego w oparciu o drugi sposób normalizacji (odzwierciedlająca znaczącą frakcję wariacji związków cholinowych i Ins) nie pozwala na rozróżnienie choroby van der Knaap od chorób lizosomalnych. Jednak, rozróżnienie to jest widoczne na płaszczyźnie pierwszej i piątej głównej składowej (PC1-PC5), wyjaśniającej ponad 74% wariacji glukozy. Analiza wykresów wartości i ładunków czynnikowych wskazuje, że metabolit ten jest podwyższony w chorobie van der Knaap. Chociaż technika ^1H MRS *in vivo* nie pozwala na ocenę poziomu glukozy w zdrowym mózgu ze względu na duże nakładanie sygnałów tego metabolitu z sygnałami innych związków w przedziale 3,4-3,9 ppm, zwiększone stężenie glukozy jest często obserwowane w obręku mózgu [54].

Druga i trzecia składowa modelu (PC2-PC3) są przydatne w odróżnieniu choroby Canavan od innych schorzeń. Interpretacja zmian biochemicznych obserwowanych w analizowanych przypadkach tego schorzenia nie zależy od sposobu normalizacji.

Główne składowe odpowiadające największej wariacji w widmach ^1H MRS *in vivo* rejestrowanych dla krótkiego TE z obszarów zainteresowania zawierających głównie istotę białą nie były przydatne w odróżnieniu wrodzonych zaburzeń glikozylacji, encefalopatii etylomalonowej, nieketotycznej hyperglycynemii czy

cytopatii mitochondrialnych od innych schorzeń neurologicznych. Pomiar widm ^1H MRS *in vivo* z innych lokalizacji mózgowych, wykorzystanie widm rejestrowanych dla długiego TE w modelach matematycznych lub zastosowanie nadzorowanych technik analizy danych mogą pomóc w rozwiązaniu tego problemu.

4.3 Publikacja A.3

Opracowanie modeli matematycznych skutecznie wspomagających różnicowanie i monitorowanie terapii wrodzonych błędów metabolizmu wymaga stworzenia dużych baz danych obejmujących zarówno przypadki schorzeń metabolicznych, jak i innych często spotykanych schorzeń neurologicznych. W związku z niską częstotliwością występowania poszczególnych wad metabolicznych, widma ^1H MRS *in vivo* muszą być gromadzone na przestrzeni wielu lat. Chociaż inżynierowie serwisowi sprawdzają stan techniczny skanerów MRI w trakcie rutynowych przeglądów, prowadzenie długoterminowego monitoringu stabilności skanera MRI przy pomocy pomiaru widm ^1H MRS *in vitro* stabilnego fantomu stanowi zasadniczy element kontroli jakości mającej zapewnić rzetelność poziomów metabolitów wyznaczanych przy pomocy standardu zewnętrznego. W publikacji A.3 przedstawiono wyniki 4,5-letniego monitoringu stabilności skanera MRI prowadzonego równoległe z badaniami MRI i ^1H MRS *in vivo* opisanymi w publikacjach A.1 i A.2.

W okresie od kwietnia 2006 do września 2010 wykonano 118 pomiarów widm ^1H MRS *in vitro* dla krótkiego TE oraz 116 widm ^1H MRS *in vitro* dla długiego TE. Pomiarzy były wykonywane przy użyciu stabilnego fantomu (o znanym składzie) z odstępem czasowym 8 dni (mediana). Analizie poddano zarówno poziomy metabolitów wyznaczone metodą skalowania do nietłumionego piksu wody, jak i poziomy metabolitów skorygowane ze względu na zmienne załadowanie cewki i wzmocnienie odbiornika. Uzyskane wyniki potwierdziły, że wartości współczynników zmienności metabolitów wyznaczonych z użyciem pierwszego sposobu normalizacji są głównie związane ze stosunkiem sygnału do szumu sygnałów MRS im odpowiadających. Natomiast analiza poziomów metabolitów poddanych korekcji ze względu na zmienne załadowanie cewki oraz wzmocnienie odbiornika w funkcji czasu pozwala na detekcję i korekcję niestabilności pracy skanera MRI.

Chociaż prowadzenie długoterminowego monitoringu stabilności skanera MRI przy użyciu badań fantomowych jest zalecane w badaniach ^1H MRS *in vivo*

wykorzystujących standard zewnętrzny, stosunkowo niewiele uwagi poświęcono do tej pory automatycznej detekcji punktów zmian (ang. *change points*) w szeregach czasowych poziomów metabolitów. Występowanie tych punktów może być spowodowane awarią skanera, wymianą części sprzętu, aktualizacją oprogramowania, interwencjami inżynierów serwisowych lub stopniowymi zmianami związanymi ze zużyciem sprzętu. Biorąc pod uwagę złożoność sprzętową współczesnych skanerów MRI, metoda detekcji punktów zmian powinna być nienadzorowana. W publikacji A.3 przedstawiono wykorzystanie automatycznej metody wykrywania zmian w przebiegach czasowych. Metoda ta opiera się na analizie kart sum skumulowanych [55] w ocenie szeregów czasowych poziomów metabolitów fantomowych skorygowanych ze względu na zmienne załadowanie cewki oraz wzmocnienie odbiornika. Monitorowany okres został podzielony na 6 przedziałów czasowych, którym przypisano odpowiednie wartości współczynników korekcyjnych ze względu na niestabilność pracy skanera MRI. Współczynniki te zostały następnie wykorzystane w analizie widm ^1H MRS *in vivo* w publikacji A.2.

W publikacji A.3 rozważono także wpływ metody normalizacji (metoda skalowania do nietłumionego piksu wody i metoda standardu zewnętrznego) i wartości TE (35 ms i 144 ms) na poziomy NAA widoczne w widmach ^1H MRS *in vivo* rejestrowanych w warunkach niepełnej relaksacji (TR=1500 ms). Porównano wpływ tych czynników na widma zarejestrowane w chorobie Canavan i w innych schorzeniach neurologicznych. Uzyskane wyniki potwierdziły szczególnie wysoką użyteczność metody standardu zewnętrznego w analizie widm rejestrowanych dla długiego TE.

7 Podsumowanie

Uzyskane wyniki potwierdzają skuteczność analizy wielowymiarowej widm ^1H MRS *in vivo* w rozróżnianiu chorób metabolicznych istoty białej (choroby van der Knaap, leukodystrofii metachromatycznej, leukodystrofii globoidalnej i choroby Canavan) od innych chorób neurologicznych (mózgowe porażenie dziecięce, encefalopatie padaczkowe, opóźnienie rozwoju) oraz zachęcają do stworzenia komputerowego systemu wspomagającego diagnostykę tych schorzeń. Ze względu na niską częstotliwość występowania poszczególnych wad metabolizmu, system ten powinien być budowany w oparciu o bazy danych rejestrowane w różnych ośrodkach, z wykorzystaniem różnych skanerów MRI, na przestrzeni wielu lat. Przydatność wielowymiarowych metod analizy danych w opracowaniu takich systemów została już potwierdzona przez twórców metod klasyfikacji guzów mózgu. W niniejszej pracy potwierdzono użyteczność zarówno stężeń metabolitów wyznaczonych z użyciem oprogramowania LCModel, jak i nierozdzielnych widm w opracowaniu matematycznych modeli diagnostycznych oraz pokazano komplementarność różnych metod normalizacji widm ^1H MRS *in vivo*.

Contribution of ^1H -MRS to Differential Diagnosis of Neurologic Disorders in Children

Agnieszka Polnik^{1*}, Maria Sokół¹, Ewa Jamroz², Justyna Paprocka²,
Magdalena Wicher³, Tomasz Banasik³, Elżbieta Marszał²,
Aleksandra Kiełtyka³, Marek Konopka³

¹ Department of Medical Physics, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology
Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101, Gliwice, Poland

² Child Neurology Department, Silesian Medical University, Medyków 16, 40-752 Katowice, Poland

³ Helimed Diagnostic Imaging, Panewnicka 65, 40-760 Katowice, Poland

Abstract

The purpose of this work was to visualize major metabolic trends in a heterogenous data set of proton magnetic resonance (^1H MRS) *in vivo* spectra acquired from children suffering from various neurological disorders. Unsupervised multivariate analysis was shown to be successful in detection of several white matter disorders as outliers in the coordinate system representing the directions of the largest variation in the whole data set and permitted characterization of specific metabolite profiles for distinct disorders.

Keywords: magnetic resonance spectroscopy *in vivo*, principal component analysis

Introduction

Neurological disorders in children, especially progressive encephalopathies, pose an important challenge in terms of diagnosis and management. In the present study, we focused on children presenting signs of progressive CNS disease associated with impairment of cognitive functioning. This group of over 500 diseases encompasses clinically progressive conditions without demonstrable neuronal loss as well as those with a demonstrable loss of neural tissue.

Although the different diseases causing progressive encephalopathies are individually rare, their cumulative incidence has been estimated to be 0.5 per 1000 live births [1]. They are predominantly caused by inborn errors of metabolism, hereafter called metabolic diseases. Progressive encephalopathies also contain a relatively large mixed group of neurodegenerative disorders without an identifiable metabolic deficiency, hereafter designated neurodegenerative disease. Inflammatory or toxic etiologies may also be considered as causes of progressive encephalopathies.

For more than a decade, conventional T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging (MRI) has been considered the best modality for imaging the brain in neurologic disorders in children [2]. MRI enables early visualization of brain lesions, however its prognostic value appears to be limited. Proton magnetic resonance spectroscopy (^1H MRS) *in vivo* and diffusion weighted imaging of the brain have been shown to increase markedly potential prognostic value [3].

^1H MRS *in vivo* is a non-invasive method providing biochemical insight into the function of the brain that complements the information derived from structural imaging. The studies of the brain are capable of quantifying steady-state metabolic levels of neurotransmitters as glutamate (Glu), N-acetyl aspartate (NAA), and gamma-amino-butyric acid (GABA), and small molecules such as choline (Cho), glutamine (Gln), glucose (Glc), myo-inositol (Ins), creatine (Cr), and lactate (Lac). As a common practice, the sum of N-acetyl aspartate and N-acetyl aspartyl glutamate (NAA+NAAg) is assessed. NAA is a marker of neuronal loss or dysfunction, the other metabolites, Cr and Lac, can be viewed as cerebral indicators of energy metabolism. Ins is a precursor for the phosphatidyl-inositol second messenger system, regulates osmotic processes

*e-mail: apolnik@io.gliwice.pl

within the brain, and its elevation may reflect demyelination and glial proliferation [4]. The choline peak measures mobile choline (mainly glycerophosphocholine (GPC), phosphocholine (PCh) and free choline).

Nowadays ^1H MRS *in vivo* can be routinely added to the diagnostic magnetic resonance imaging as a source of biochemical information obtained in a non-invasive way. Large libraries of spectra corresponding to various disorders are expected to be useful in development of diagnostic decision support systems [5]. In recent years there have been several attempts to create mathematical models enabling classification of neurological disorders in children [6, 7]. The purpose of this work was to evaluate clinical utility of the technique based on a large set of spectra acquired from pediatric patients.

The studied cases have either been discovered through screening programs for metabolic diseases or they have been registered after clinical presentation suggestive of metabolic deficiency. In the diagnosis evaluation along with MRI and MRS additional diagnostic methods were usually incorporated, as electrophysiological, immunological, pathomorphological and molecular studies.

Experimental Procedures

Patients

The studied group consisted of 55 children with neurological disorders (16 girls, 39 boys, age range: 3-75 months, median age: 24 months) diagnosed with epileptic encephalopathy, cerebral palsy, developmental delay and neurometabolic disorders (including 2 cases of Canavan disease [CD], 3 cases of metachromatic leukodystrophy [ML], 2 cases of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts [MLC] and 4 cases of neurometabolic disorders of unknown origin [U]).

^1H MRS *in vivo*

The spectra were acquired bilaterally from the volumes of interest localized in the frontal, periventricular (laterally to the ventricles) and parieto-occipital brain regions. The spectra were acquired using a GE 1.5-T Signa scanner. The acquisition parameters were as follows: echo time 35 ms, repetition time 1500 ms, bandwidth 2500 Hz, samples 2048, number of signal averages 128, voxel volume: 8 ml, PRESS localization sequence.

Data analysis

The metabolite levels were determined with the use of LCModel software under the assumption that the spectra acquired *in vivo* are linear combinations of the spectra measured *in vitro* [8]. The software enables automatic referencing, phase correction, baseline correction and signal fitting. The spectra were evaluated for the following metabolites: NAA, NAA+NAAG, Cr, Ins, GPC+PCh, Glu, Glu+Gln. The metabolite levels were determined using water scaling technique and were not corrected for relaxation (besides the application of water attenuation factor of

0.7). The obtained concentrations in the whole data set were adjusted for age related variation based on the linear regression analysis applied to the epileptic encephalopathy and developmental delay groups (assuming homogeneity of the regression slopes in all the groups). The cerebral palsy group was not involved in calculation of the age correction because the patients did not span the whole age range. The metabolic disorders group was also excluded due to severe variations of the metabolites' concentrations not related to the age differences. The correction was done for each brain region separately. The NAA and NAA+NAAG levels were found to be influenced by age in all three brain regions, while GPC+PCh was found to correlate with age in the parieto – occipital area.

To facilitate recognition of the major trends in our heterogeneous data, principal component analysis (PCA) was exploited [9]. For a graphical illustration of the method let us consider a set of observations characterized by three variables x_1, x_2, x_3 (Fig. 1). The main idea behind the analysis technique is that each observation can be thought of as a single point in the coordinate system formed by the measured variables as axes. Given that our set of variables is not free from co-linearity it can be expected that a new coordinate system may be required to provide a better insight into the data structure. The three-dimensional system is not required to define relative positions of the observations in the measurement space. PCA is the method enabling reduction of the dimensionality with a minimal loss of information in the least square sense. It is accomplished by a rotation of the initial axes so that the first direction is associated with a maximal variance. The second direction, orthogonal to the first one, is associated with the next largest variance. The procedure continues until overall variation in the dataset is accounted for. However, bearing in mind that the axes are ordered according to the decreasing amount of the variance, discarding the directions associated with a small proportion of diversity gives the opportunity of dimensionality reduction without a substantial loss of information. Fig. 1a presents a rotation of the original axes. After discarding the third component due to a small proportion of variance explained the plane spanned by the first two principal components could constitute a new coordinate system. The coordinates of the observations in a-dimensional principal component space, termed scores, are computed as follows: $\mathbf{T} = \mathbf{XP}$, where: $\mathbf{T}_{[n \times m]}$ is a matrix of the principal component scores, $\mathbf{X}_{[n \times m]}$ is a data matrix comprised of n objects as rows and m variables as columns, $\mathbf{P}_{[m \times a]}$ is a matrix of the principal component loadings reflecting the cosines of the angles between the original and principal components directions. The contribution of a variable to a loading vector increases as the angle between this variable and principal component direction approaches 0 (i.e. loading value approaches 1) or 180° (i.e. loading value approaches -1). Thus, positive or negative contribution is considered, respectively. Figs. 1b and 1c present the scores and loading plots resulting from dimensionality reduction from 3 to 2. These plots are complementary and should be analyzed simultaneously. The scores plot displays each observation as a point.

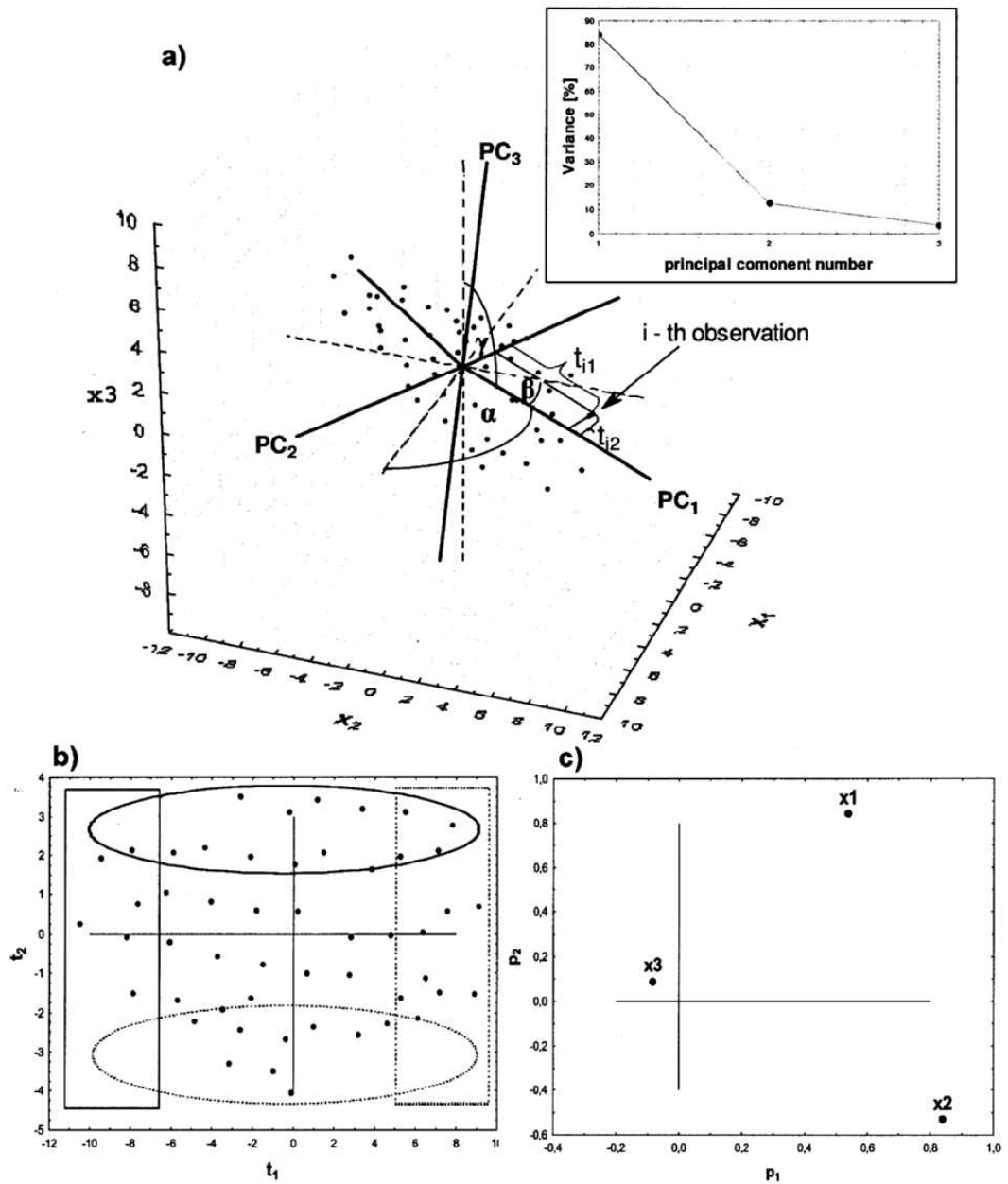


Fig. 1. Geometrical interpretation of PCA.

a) The dataset consisting of the observations described by the variables x_1, x_2 and x_3 is presented in a three-dimensional coordinate system. Due to co-linearity between the variables a three-dimensional system is not required to define relative positions of the observations in this space. The aim of PCA is to find a variance based coordinate system by a rotation of the original axes. The angles α, β and γ provide information about the contribution of the initial variables to PC_1 . The cosines of these angles are termed principal component loadings. The respective angles for PC_2 and PC_3 are not shown. The percent variance explained by the third principal component is 3% so this component could be discarded to obtain dimensionality reduction from 3 dimensions to 2. The coordinates of the observations in the new coordinate systems are termed scores. The figure presents the scores for the i -th observation on the first and the second principal components (t_{i1} and t_{i2} , respectively).

b) Scores plot (t_1 vs t_2) obtained from dimensionality reduction by PCA. The observations characterized by: the highest scores on PC_1 are marked with a dotted rectangle, the lowest scores on PC_1 are marked with a solid rectangle, the highest scores on PC_2 are marked with a solid ellipse, the lowest scores on PC_2 are marked with a dotted rectangle.

c) Loadings plot (p_1 vs p_2) obtained from dimensionality reduction by PCA.

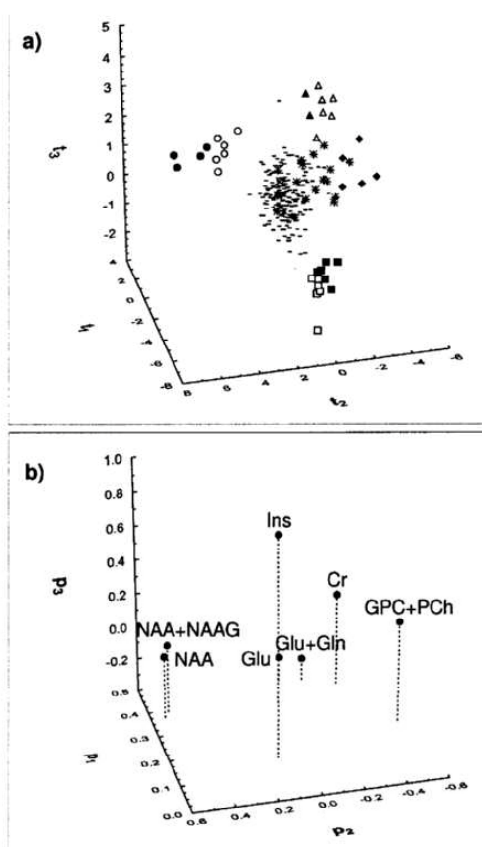


Fig. 2. (a) Scores plot obtained from PCA analysis (horizontal lines represent the group of children diagnosed with epileptic encephalopathy, cerebral palsy and developmental delay; squares represent two cases of MLC, dots represent two cases of CD, triangles and diamonds represent three cases of ML, stars represent U).

(b) Loadings plot. When unit-variance scaling is used both the scores and the loadings are dimensionless.

Natural clustering of the spectra can be observed in this plot. The loadings plot reflecting the contributions of the original features to the principal components allows the variables responsible for this clustering to be recognized. Each point in this plot represents an individual variable. The variables expressing high absolute values of the loadings along a particular direction influence the redistribution of the observations along this direction the most. The sign of the loading indicates the direction of this influence, i.e. the observations assigned positive scores present higher values of the variables associated with the positive loadings and lower levels of the variables associated with the negative loadings. As far as our three-dimensional example is concerned, the analysis of the scores and loadings plots reveals that the variable x_2 has the highest contribution to redistribution of the observations along the first principal component (PC_1). Taking 50% of the maximum of the absolute values of the loading vector as a cut-

Table 1. Principal component loadings (dimensionless).

	PC1	PC2	PC3
Cr	0.43	-0.35	0.15
Glu	0.47	-0.09	-0.26
Ins	0.16	0.11	0.89
NAA	0.37	0.53	-0.003
GPC+PCH	0.24	-0.53	0.20
NAA+NAAG	0.40	0.50	0.01
Glu+Gln	0.46	-0.20	-0.27

off point above which all variables are considered to be significant contributors to the components, the variable x_1 also should be involved in the model interpretation. The variables x_1 and x_2 , assigned positive loadings on PC_1 , tend to be increased in the observations assigned positive scores on PC_1 (the observations characterized by the highest scores on PC_1 are marked with a dotted rectangle) as compared to the observations assigned negative scores on PC_1 (the observations characterized by the lowest scores on PC_1 are marked with a solid rectangle). The variables x_1 and x_2 are also responsible for the separation along the second principal component (PC_2). The variable x_1 , assigned positive loading on PC_2 , tends to be higher in the observations assigned positive scores on PC_2 (the observations characterized by the highest scores on PC_2 are marked with a solid ellipse) than in the observations assigned negative scores on PC_2 (the observations characterized by the lowest scores on PC_2 are marked with a dotted ellipse). In case of the variable x_2 , assigned negative loading on PC_2 , the observations assigned positive scores on PC_2 tend to present lower x_2 values than the observations assigned negative scores on this component.

The variable x_3 located not far away from the origin of the coordinate system is not well represented by the plane formed by two first principal components and has no influence on the redistribution of the observations.

The advantages of using PCA for dimensionality reduction are clearly seen for higher dimensional data sets but the principle of the method remains the same.

In this study each spectrum is represented by a set of seven metabolite levels so it can be considered as a single point in a seven-dimensional metabolite space. Prior to multivariate analysis the metabolite levels were unit-variance scaled.

Results

Fig. 2 presents the three-dimensional scores and loadings plots obtained from PCA analysis. The presented scores plot can be interpreted as a 3-dimensional view of 7-dimensional space of metabolite levels. Table 1 collects the loadings for the first three components, PC_1 , PC_2 and PC_3 .

As seen all the evaluated variables contribute positively to PC_1 (only the contribution of Ins is below the

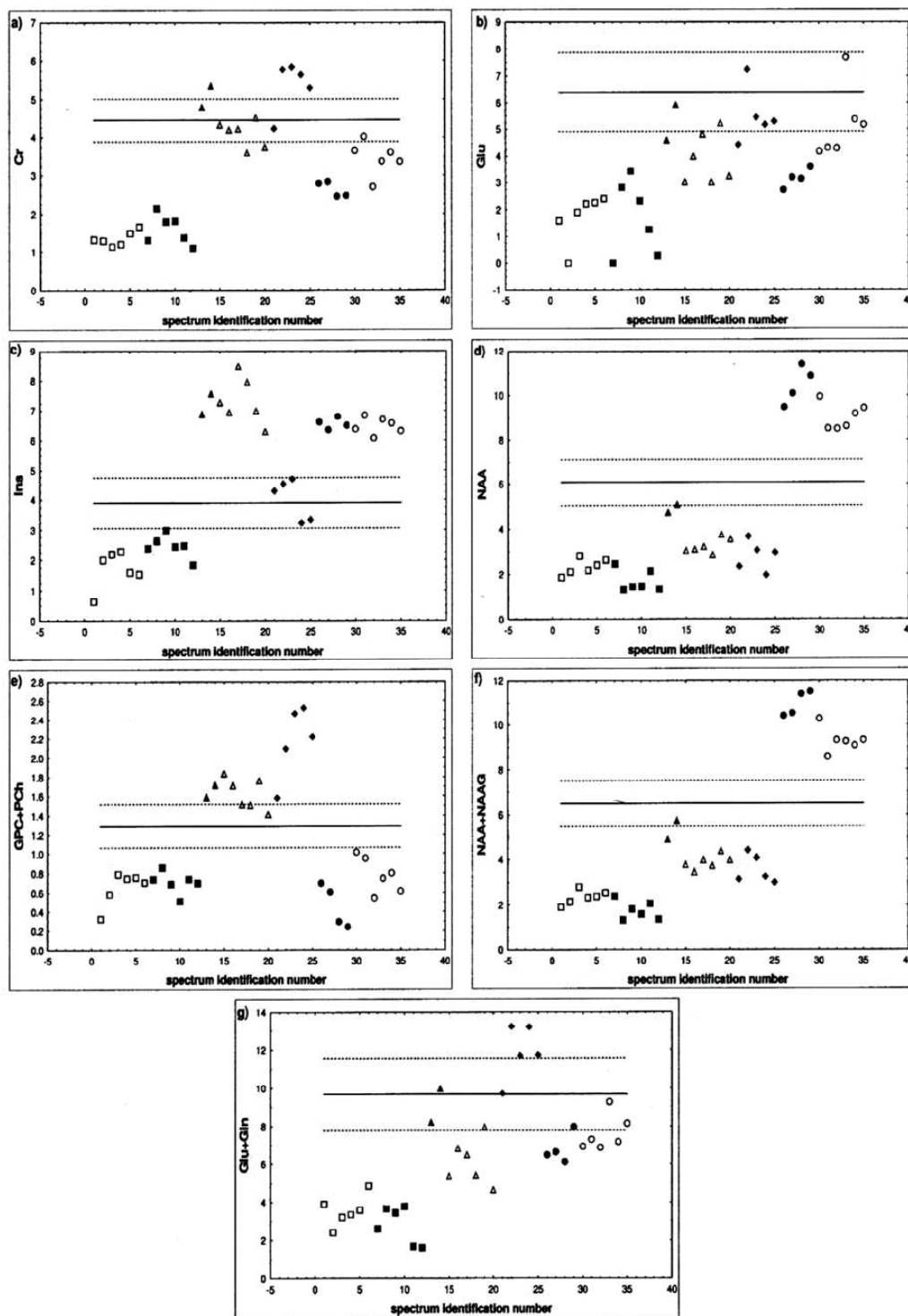


Fig. 3. The metabolite levels [mM] measured in MLC (squares), ML (triangles and diamonds), CD (dots): (a) Cr, (b) Glu, (c) Ins, (d) NAA, (e) GPC+PCh, (f) NAA+NAAG, (g) Glu+Gln. The solid line indicates mean metabolite levels in the group of patients diagnosed with epileptic encephalopathy, cerebral palsy and developmental delay. The dotted lines indicate means \pm standard deviations in this group.

threshold of 50% of the loading vector maximum). Thus, the spectra separated along this component are differentiated due to changes in the content of several metabolites, i.e. the observations characterized by low metabolite content of Cr, Glu, NAA, GPC+PCh, NAA+NAAG and Glu+Gln will tend to have negative scores on PC₁. Otherwise, the location should be opposite. PC₂ is dominated by a positive contribution of NAA and NAA+NAAG and a negative contribution of GPC+PCh. Cr also loads on this component negatively but not as significantly as the abovementioned metabolites. The spectra characterized by the high NAA and NAA+NAAG and low GPC+PCh levels will tend to have high positive scores on PC₂. PC₃ is dominated by a positive contribution of Ins. The spectra characterized by a high Ins content will have high positive scores on PC₃. The presented model accounts for 86.1% of the variation in the data set.

The technique revealed that ML, CD, MLC can be clearly distinguished from the rest of the observations and occupy non-overlapping regions of the principal components space indicating specific metabolic profiles in comparison to the patients situated close to the origin of the coordinate system in the scores plot: diminishment of all the evaluated metabolite levels in MLC; elevation of NAA, NAA+NAAG, Ins and decrease of GPC+PCh, Cr in CD; elevation of Ins, GPC+PCh and decrease of NAA, NAA+NAAG in two cases of ML. The third case of ML (represented in Fig. 2 by the diamonds) seems to be different than the other two cases.

Since a comparison of the ranges of metabolite levels between various neurological disorders is very important from a diagnostic point of view, the PCA model could be complemented with a traditional univariate presentation of the results. This approach can also be exploited to visualize separation of neurometabolic disorders from the main bulk of data represented by epileptic encephalopathy, cerebral palsy and developmental delay. Presentation of abnormalities occurring in rare metabolic disorders against changes seen in cases commonly encountered in everyday practice may provide useful clinical information. Scatterplots presenting metabolite levels measured in CD, ML and MLC with respect to the mean levels obtained in the group of children diagnosed with epileptic encephalopathy, cerebral palsy and developmental delay are presented in Fig. 3. The results of PCA model can be compared with the dependences shown in the scatterplots. As seen from these plots, it is MLC that is characterized by a decrease in the concentrations of all metabolites. For CD the GPC+PCh concentration is similar as in MLC (Fig. 3e). However, significantly higher levels of NAA, NAA+NAAG and Ins (Figs. 3c, 3d, 3f) are responsible for the location of this disease in the left upper area of the three-dimensional principal components space. The higher level of GPC+PCh and the lower concentrations of NAA and NAA+NAAG in ML as compared to CD (Figs. 3d, 3e, 3f) may explain the separation of ML and CD along the second principal component. The Cr concentration observed in ML to be higher than in CD (Fig. 3a) influences the mentioned separation as well, since this variable contributes to the second principal com-

ponent. Two ML cases are characterized by the increased level of Ins (Fig. 3c), similarly as in CD, which causes these cases to locate in the upper area of the coordinate system. It may be also noticed, that the most important difference between the outlying case diagnosed with ML and the aforementioned ones lies in the lower level of Ins and the higher level of GPC+PCh (Figs. 3c, 3e).

Discussion of Results

¹H MRS *in vivo* has been effectively combined with multivariate projection methods. PCA was successfully used in differentiation of metastases originating from various primary cancers [10] or in the separation between gliomatosis cerebri, low-grade gliomas and controls [11]. Given that PCA is a dimensionality reduction technique which is optimal in the least square sense this method has been widely utilized for spectral data compression as a preprocessing step before linear discriminant analysis. However, if the direction of the maximal total variance in the data set is coincident with the direction of the large between-group variance, the separation of the spectra according to the class membership can be visualized in the scores plot of the first principal components.

This work also proves usefulness of an unsupervised dimensionality reduction based analysis of the heterogeneous spectroscopic data sets. As ¹H MRS *in vivo* should be particularly suited for detection of metabolite defects, several neurometabolic white matter diseases are shown to be outliers in the whole data set and are identified as the distinct disorders. Visualization of the differences between patients in the principal component space seems to be an interesting alternative to the classical data evaluation approaches which are often limited to case studies due to rarity of the discussed diseases.

The conclusions drawn from our model are in accord with the published data. As reported elsewhere high NAA is characteristic for CD and is due to a deficiency of aspartoacylase, the enzyme hydrolyzing NAA to acetate and aspartic acid [12]. High Ins [13] and low GPC+PCh and Cr were also reported as metabolic alterations in this disease [14]. ¹H MRS *in vivo* spectra acquired from the most affected white matter in MLC show decreases in the content of all metabolites which is consistent with white matter rarefaction [15, 16]. Reduction of the levels of all the evaluated metabolites except Ins was also reported [7]. ML caused by a deficiency of the enzyme arylsulfatase-A has been described as a disorder characterized by a generalized increase of Ins and an abnormally low NAA level [17, 18] but in contrast to our findings the reduction of GPC+PCh was also mentioned [18].

This work extends the aforementioned studies by utilizing simple data structure visualization techniques to present the inter-spectra relationships between various disorders. Automatic analysis of the spectra by means of LCMoDel software combined with easily interpretable graphical representations of the data set could contribute to a more widespread use of ¹H MRS in a clinical practice.

As far as diagnostic potential of the presented PCA model is concerned, the metabolite levels measured in patients with unknown diagnosis could be projected onto the computed principal component space and disease classification could be inferred. The information obtained from the model could narrow the list of the most probable disorders. However, a large number of cases representing various diseases is of crucial importance to ensure model generalization ability, especially in the case of supervised analysis such as partial least squares – discriminant analysis or linear discriminant analysis, not presented in this study. Ideally, in the case of rare disorders, it would be required to create classification models based on the data acquired in many institutions. It has already been shown that using linear discriminant analysis it is possible to obtain clinically useful mathematical models from data acquired on various scanners [5].

Conclusions

Multivariate projection techniques of data analysis proved their usefulness in solving classification problems of ¹H MRS spectra and supported their role as a potential aid in a medical decision making. The significant separation of various neurometabolic disorders in the principal component space obtained in an unsupervised manner could be treated as a first step on the way to creation of computer-based decision support system.

References

1. SURTEES R. Understanding neurodegenerative disorders. *Curr. Paediatr* **12**, 191, 2006.
2. BARKOVICH A. J. The encephalopathic neonate: choosing the proper imaging technique. *AJNR Am. J. Neuradiol.* **163**, 1816, 1997.
3. RUTHERFORD M. A., PENNOCK J. M., COUNSELL S. J., MERCURI E., COWAN F. M., DUBOWITZ L. S. M., EDWARDS A. D., Abnormal magnetic resonance signal in the internal capsule predicts poor neurodevelopmental outcome in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* **102**, 323, 1998.
4. WALECKI J., TARASOW E., KUBAS B., CZERNICKI Z., LEWKO J., PODGORSKI J., SOKOL M., GRIEB P. Hydrogen-1 MR spectroscopy of the peritumoral zone in patients with cerebral glioma: assessment of the value of the method. *Acad. Radiol.* **10**, 145, 2003.
5. TATE A. R., UNDERWOOD J., ACOSTA D. M., JULIÀ-SAPÉ M., MAJÓS C., MORENO-TORRES A., HOWE F. A., VAN DER GRAAF M., LEFOURNIER V., MURPHY M. M., LOOSEMORE A., LADROUE C., WESSELING P., LUC BOSSON J., CABAÑAS M. E., SIMONETTI A. W., GAJEWICZ W., CALVAR J., CAPDEVILA A., WILKINS P. R., BELL B. A., RÉMY C., HEERSCHAP A., WATSON D., GRIFFITHS J. R., ARÚS C. Development of a decision support system for diagnosis and grading of brain tumours using *in vivo* magnetic resonance single voxel spectra. *NMR Biomed.* **19** (4), 411, 2006.
6. VAN DER VOORN J. P., POWELS P. J., HART A. A., SERRARENS J., WILLEMSSEN M. A., KREMER H. P., BARKHOF F., VAN DER KNAAP M. S. Childhood white matter disorders: quantitative MR imaging and spectroscopy. *Radiology* **241** (2), 510, 2006.
7. BIZZI A., CASTELLI G., BUGIANI M., BARKER P. B., HERSKOVITS E. H., DANESI U., ERBETTA A., MORONI I., FARINA L., UZIEL G. Classification of childhood white matter disorders using proton MR spectroscopic imaging. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **29** (7), 1270, 2008.
8. PROVENCHER S.W. Estimation of metabolite concentrations from localized *in vivo* proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* **30**, 672, 1993.
9. JOLLIFFE I. T. Principal component analysis, 2nd ed.; Springer: New York, 2002.
10. SJØBAKK T.E., JOHANSEN R., BATHEN T.F. Metabolic profiling of human brain metastases using *in vivo* proton MR spectroscopy at 3T. *BMC Cancer* **27** (7),141, 2007.
11. GALANAUD D., CHINOT O., NICOLI F. Use of proton magnetic resonance spectroscopy of the brain to differentiate gliomatosis cerebri from low-grade glioma. *J. Neurosurg.* **98** (2), 269, 2003.
12. ENGELBRECHT V., RASSEK M., GARTNER J., KAHN T., MODDER U. Magnetic resonance tomography and localized proton spectroscopy in two siblings with Canavan's disease. *Fortschr. Rontgenstr.* **163**, 238, 1995 [In German].
13. CASTILLO M., KWOCK L., MUKHERJI S. K. Clinical applications of proton MR spectroscopy. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **17**, 1, 1996.
14. GRODD W., KRAGELOH-MANN I., KLOSE U., SAUTER R. Metabolic and destructive brain disorders in children: findings with localized proton MR spectroscopy. *Radiology* **181**, 173, 1991.
15. MEJASKI-BOSNJAK V., BESENSKI N., BROCKMANN K., POWELS P. J., FRAHM J., HANEFELD F. A. Cystic leukoencephalopathy in a megalencephalic child: clinical and magnetic resonance imaging/magnetic resonance spectroscopy findings. *Pediatr. Neurol.* **16** (4), 347, 1997.
16. DE STEFANO N., BALESTRI P., DOTTI M. T., GROSSO S., MORTILLA M., MORGESE G., FEDERICO A. Severe metabolic abnormalities in the white matter of patients with vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. A proton MR spectroscopic imaging study. *J. Neurol.* **248**, 403, 2001.
17. KRUSE B., HANEFELD F., CHRISTEN H. J., BRUHN H., MICHAELIS T., HA'NICKE W., FRAHM J. Alterations of brain metabolites in metachromatic leukodystrophy as detected by localized proton magnetic resonance spectroscopy *in vivo*. *J. Neurol.* **241**, 68, 1993.
18. SENER R. N. Metachromatic leukodystrophy. Diffusion MR imaging and proton MR spectroscopy. *Acta Radiol.* **44**(4), 440, 2003.

9 Tekst publikacji A.2

Bridging the gap between metabolic profile determination and visualization in neurometabolic disorders: a multivariate analysis of proton magnetic resonance *in vivo* spectra

Agnieszka Skorupa^{a*}, Ewa Jamroz^b, Justyna Paprocka^b, Maria Sokół^a, Magdalena Wicher^c and Aleksandra Kiełtyka^c

The purpose of this work was to check the degree of overlap between rare inborn errors of metabolism and other neurological disorders using principal component analysis of proton magnetic resonance spectroscopy (¹H MRS) *in vivo* data. We examined 60 patients (median age of 22 months). Fourteen of them were diagnosed with neurometabolic disorders (three cases of metachromatic leukodystrophy, two cases of Canavan disease, two cases of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, three cases of mitochondrial cytopathy, one case of nonketotic hyperglycinemia, one case of globoid leukodystrophy, one case of congenital disorders of glycosylation, and one case of ethylmalonic encephalopathy). The remaining 46 patients were diagnosed with epilepsy, cerebral palsy, and developmental delay. Results obtained from principal component analysis of complete unresolved ¹H MRS *in vivo* spectra were interpreted parallelly with LCModel-derived metabolite levels. The main attention was paid to the following metabolites: *N*-acetylaspartate, glutamate + glutamine, creatine, choline, myo-inositol signal with an uncertain contribution of glycine, and glucose. ¹H MRS *in vivo* coupled with multivariate analysis is an efficient tool in visualization of metabolic abnormalities in several inborn errors of metabolism (metachromatic leukodystrophy, globoid leukodystrophy, megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, and Canavan disease). Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: magnetic resonance spectroscopy *in vivo*; principal component analysis; neurometabolic disorders

1. INTRODUCTION

Inborn errors of metabolism comprise a diverse group of more than 500 disorders caused by single gene defects. Many of these disorders individually are extremely rare, but collectively, they are relatively common. Their incidence is estimated at 40 per 10,000 live births [1]. Establishment of early and precise diagnosis is challenging for most clinicians. Extensive laboratory evaluation, genetic testing, and imaging are performed to identify the underlying defect. In detection of neurometabolic disorders, the role of magnetic resonance imaging (MRI) is especially appreciated because of high sensitivity of the technique for brain lesions visualization [2]. However, various pathological processes may be characterized by similar signal abnormalities visible in T1-weighted and T2-weighted MRI images. Thus, additional sources of diagnostic information are warranted.

Proton magnetic resonance spectroscopy (¹H MRS) *in vivo* has been shown to successfully differentiate between white matter disorders characterized by various pathological features [3]. Additionally, the technique has proven to provide disease-specific information, for example, in Canavan disease (CD) [4], nonketotic hyperglycinemia (NKH) [5], creatine deficiency syndromes [6], or mitochondrial complex II deficiency [7]. Noninvasiveness, wide availability, and automated data acquisition ("pushbutton"

approach) using the same hardware as structural imaging render this method particularly suitable for a collection of large databases of spectra corresponding to various disorders. The development of such databases is integrally associated with a significant progress in data analysis area. During the last two decades, the assessment of metabolic abnormalities using ¹H MRS *in vivo* has advanced from simple univariate evaluation of differences between peak areas or ratios to application of multivariate projection techniques, support

* Correspondence to: Agnieszka Skorupa, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Department of Medical Physics, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice, Poland.
E-mail: askorupa@io.gliwice.pl

a A. Skorupa, M. Sokół
Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Department of Medical Physics, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice, Poland

b E. Jamroz, J. Paprocka
Silesian Medical University, Child Neurology Department, Medyków 16, 40-752 Katowice, Poland

c M. Wicher, A. Kiełtyka
Helimed Diagnostic Imaging, Panewnicka 65, 40-752 Katowice, Poland

Table I. The characteristics of the patients diagnosed with inborn errors of metabolism

Patient ID, sex, age (months)	Clinical presentation	MRI of the head	Diagnosis
Patient 1, male, 52	Developmental delay, macrocephaly, decreased muscle tone with preserved tendon reflexes	Generalized white matter changes, bilateral cystic areas in temporal lobes	MLC
Patient 2, male, 25	Developmental delay, macrocephaly, decreased muscle tone with preserved tendon reflexes	Generalized white matter changes, bilateral cystic areas in temporal lobes	MLC
Patient 3, male, 31	Progressive encephalopathy	Dys- and demyelinating changes of corona radiata, centrum semiovale, splenium and genu of corpus callosum	MLD
Patient 4, male, 30	Progressive encephalopathy, spastic paraparesis, contractures, weight deficiency	Dys- and demyelinating changes of corona radiata, centrum semiovale, splenium and genu of corpus callosum	MLD
Patient 5, female, 43	Progressive encephalopathy, epilepsy with polymorphic seizures Without visual contact, spastic tetraparesis	Extensive periventricular white matter hyperintensity on T2-weighted MR images, widening of the ventricular system	MLD
Patient 6, male, 8	Developmental delay, macrocephaly, nystagmus, increased muscle tone, brisk tendon reflexes	Extensive white matter changes (subcortical and periventricular white matter, internal capsules) with sparing corpus callosum	CD
Patient 7, male, 18	Developmental delay, macrocephaly, strabismus convergens, increased muscle tone, brisk tendon reflexes	Extensive white matter changes - myelin loss (especially visible in subcortical white matter, globus pallidus, thalamus) with sparing corpus callosum	CD
Patient 8, female, 4	Developmental delay, refractory epilepsy with polymorphic seizures, microcephaly, strabismus, without visual contact,	Complete myelin loss (partially myelinated brainstem), increased pericerebral spaces, slight ventricular system enlargement, hypoplastic corpus callosum	NKH
Patient 9, female, 16	Cerebellar syndrome, improper fat distribution	Cerebellar atrophy	CDG
Patient 10, male, 30	Progressive encephalopathy, strabismus, increased muscle tone of lower extremities with exaggerated tendon reflexes, walk on the broad basis	Extensive areas of signal hyperintensity of occipital, parietal and frontal lobes on T2-weighted MR images	GLD
Patient 11, female, 27	Developmental delay, strabismus convergens, hypotonia with preserved tendon reflexes	Normal MRI	EE
Patient 12, female, 10	Progressive encephalopathy, refractory epilepsy with polymorphic seizures, dysmorphic features, pyramidal-extrapyramidal dysfunction, weight deficiency	Cortical-subcortical atrophy, widening of the pericerebral spaces, (especially in the frontal and temporal regions) and the ventricular enlargement	MC
Patient 13, female, 15	Progressive encephalopathy, without visual contact, pyramidal-extrapyramidal dysfunction	Hyperintensity of signal of basal ganglia (lentiform nucleus: putamen, globus pallidus), head and corpus of caudate nucleus) and periventricular, subcortical white matter, increased pericerebral spaces with ventricular system enlargement	MC
Patient 14, male, 23	Progressive encephalopathy, cardiomyopathy, dysmorphic features, cerebellar syndrome, weight deficiency	Dysmyelination changes - hyperintensive signal in T2-weighted MR images of the posterior areas of	MC

(Continues)

Table 1. (Continued)

Patient ID, sex, age (months)	Clinical presentation	MRI of the head	Diagnosis
		the lateral ventricles, thalami and mesencephalon	

MRI, magnetic resonance imaging; MLC, megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts; MLD, metachromatic leukodystrophy; CD, Canavan disease; NKH, nonketotic hyperglycinemia; CDG, congenital disorders of glycosylation; GLD, globoid leukodystrophy; EE, ethylmalonic encephalopathy; MC, mitochondrial cytopathy.

vector machines, and neural networks [8,9]. The choice of the optimal technique depends on the data structure under investigation.

In this work, it was assumed that the spectra acquired from patients suffering from neurometabolic disorders reveal unusual metabolic patterns in comparison with cases commonly seen in a clinical practice revealing no biochemical defect. Thus, the chosen data analysis technique was required to be sensitive to extreme cases and high variance features. Furthermore, to assure a proper generalization ability of the model built based on a small number of cases representing individual neurometabolic disorders, the method should incorporate no knowledge about the diagnosis. Multivariate principal component analysis (PCA) is one of the techniques fulfilling the aforementioned requirements [10]. This method enables analysis of the complete unresolved spectra and requires no a priori information about the signals occurring in the spectrum. The purpose of this work was to check the degree of overlap between rare neurometabolic disorders and common pediatric cases using PCA of ^1H MRS *in vivo* spectra.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Subjects

During the period from July 2006 to November 2009, 60 children (22 women, 38 men, median age: 22 months, age range: 2–52 months) were examined prospectively using MRI and ^1H MRS *in vivo*. The studied children were admitted for etiologic diagnostic evaluation (or diagnosis verification) because of the suspicion of neurometabolic disorder due to clinical features or abnormal laboratory results. On the basis of detailed metabolic and neuroimaging screening, 14 patients were diagnosed with neurometabolic disorders. This group (group A) included the following: three cases of metachromatic leukodystrophy (MLD), two cases of CD, two cases of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC), three cases of mitochondrial cytopathy (MC), one case of NKH, one case of globoid leukodystrophy (GLD), one case of congenital disorders of glycosylation (CDG), and one case of ethylmalonic encephalopathy (EE). Inclusion criteria to this group were as follows:

- Presence of characteristic clinical symptoms of progressive encephalopathy (according to the child age).
- Biochemical and radiological indications of progressive encephalopathy.
- Written consent of the patients' parents.

The characteristics of the patients diagnosed with neurometabolic disorders are presented in Table I.

The remaining patients (group B) were diagnosed with cerebral palsy, global developmental delay, and epileptic encephalopathy, which were defined in terms of three conditions:

- Cerebral palsy was defined as a static, nonprogressive motor impairment of early onset, featuring objective changes in tone, muscle, strength, posture, reflexes, and motor skills on examination (relevant anamnesis, mainly cerebellar or dyskinetic form of cerebral palsy, abnormal brain MRI).
- Global developmental delay according to the American Academy of Neurology is an objective, significant delay in two or more developmental domains (frequently, all are affected), gross or fine motor function, speech or language, cognition, personal-social and activities of daily living (intelligence quotient <70, dysmorphic features, abnormal head circumference, minor neurological signs, normal brain MRI).
- Epileptic encephalopathies are characterized by a severe brain dysfunction of an early age that manifests with electrographic electroencephalography paroxysmal activity, polymorphic and intractable seizures, cognitive, behavioral and neurological deficits that may be relentless.

The authors performed detailed metabolic work-up (aminoacidopathies, organic acidurias, fatty acid oxidation defects, mitochondrial cytopathies, urea cycle disorders, lysosomal storage diseases, peroxisomal disorders, and CDG syndrome), ophthalmological, and psychological assessment as well as neurophysiological examinations. In some patients, molecular study or pathomorphological examination (muscle, nerve, and cornea) was deemed necessary.

Age of the patients was constrained to the range of 1 to 60 months.

The study was approved by the Bioethics Committee of the Institute of Oncology in Gliwice.

2.2. Magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy *in vivo*

Magnetic resonance imaging and ^1H MRS *in vivo* were performed using a 1.5T GE scanner equipped with a transmit/receive head coil. The volumes of interest were located in the frontal, periventricular (laterally to the ventricles), and in parieto-occipital areas (Figure 1).

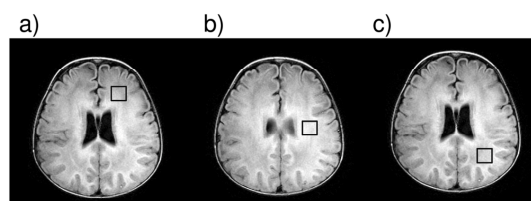


Figure 1. Localization of volumes of interest for ^1H MRS *in vivo*: (a) in the frontal area, (b) in the periventricular area (laterally to the ventricles), and (c) in the parieto-occipital area.

It was intended to record the spectra bilaterally from all the aforementioned locations, but because of motion of the patients and time constraints, the number of measured spectra was reduced in some cases. A total number of 103 frontal localizations, 92 periventricular localizations (laterally to the ventricles), and 83 parieto-occipital localizations were included. Thus, 278 ^1H MRS *in vivo* spectra were evaluated.

Both water-suppressed and water-unsuppressed ^1H MRS *in vivo* spectra were acquired. The acquisition parameters were as follows: echo time (TE) 30 ms, repetition time (TR) 1500 ms, voxel volume 8 ml, number of signal averages: 128 (for water-suppressed spectra) and 16 (for water-unsuppressed spectra), bandwidth of 2500 Hz, and 2048 samples.

^1H MRS *in vivo* spectrum is characterized by metabolic, lipid, and macromolecular contributions. Preliminary analysis revealed that the spectral region from 0.5 to 1.8 ppm, characteristic of lipids and macromolecules, constitutes a substantial source of variability in the dataset not directly related to discrimination between groups A and B. Thus, the spectral region explored in multivariate analysis was confined to 1.8–3.95 ppm (226 original variables). Of note, the lactate signal (Lac, doublet around 1.33 ppm) is often found to overlap with lipids and macromolecules. Abnormal levels of this metabolite were detected in neurometabolic disorders [11,12], so the contribution of Lac to the signal in the excluded region should be clarified. Evaluation of the long TE spectra (TE = 144 ms, TR = 1500 ms, measured additionally to the short TE ones) with LCModel [13] revealed that in only one patient (belonging to the group B), the Lac level was quantified with Cramer–Rao lower bounds below 20% (criterion for an estimate of acceptable reliability). Detailed analysis of long TE data was beyond the scope of this paper.

2.3. Multivariate analysis

2.3.1. Data processing

Preprocessing of the raw data before multivariate analyses of the unresolved spectra included eddy current correction [14], zero filling, 3 Hz exponential line broadening, Fourier transformation, frequency alignment, residual water signal removal between 4.25 and 5.25 ppm by means of Hankel–Lanczos singular decomposition algorithm. Eddy current correction markedly reduces zero-order phase errors. No additional phasing was carried out. The procedure was identical as that by Devos *et al.* [15].

In this work, two signal normalization approaches were evaluated: scaling to the total signal intensity of the main metabolites and calibration based on absolute reference.

In the former method, total intensities of the main metabolites were computed by summing signal intensities in the spectral ranges: from 1.9 to 2.1 ppm (*N*-acetylaspartate [NAA]), 3.1 to 3.3 ppm (choline [Cho]), 2.9 to 3.1 ppm (creatine [Cr]), 3.45 to 3.60 ppm (myo-inositol [Ins] with an uncertain contribution of glycine [Gly]), and 2.1 to 2.5 ppm (glutamine [Gln] and glutamate [Glu]). Because separation of Glu and Gln is difficult at 1.5 T, the sum of Glu and Gln (referred to as Glx) is usually evaluated. Ins and Gly cannot be resolved from each other in short TE spectra. Thus, the signal at 3.56 ppm is abbreviated as Ins(Gly?). The calibration factor was computed as a reciprocal of this sum.

In the absolute reference technique, a reference spectrum was measured from a phantom with a known content located centrally in the coil. The calibration factor was computed according to the equation:

$$f_{\text{calib}} = \frac{m_{\text{true}}}{m_{\text{LCM}}} \quad (1)$$

where m_{true} is the true NAA concentration in the phantom (20 mM) and m_{LCM} is the concentration output by LCModel [13]. Coil loading was automatically corrected based on the principle of reciprocity using a correction factor $10^{0.005(TG-65)}$ where TG denotes transmitter gain [16]. The metabolite levels were also adjusted for variations in receiver gain. Time-dependent hardware changes were periodically monitored using a stable phantom provided by a scanner manufacturer. The phantom contains 12.5 mM NAA, 10 mM Cr, 3 mM Cho, 7.5 mM Ins, 12.5 mM Glu, 5 mM Lac, 50 mM potassium phosphate monobasic, 12.5 mM sodium hydroxide, 0.1% sodium azide, 1 ml/l magnevist. During the period from July 2006 to November 2009, 94 ^1H MRS *in vitro* measurements (TE = 35 ms, TR = 1500 ms, number of signal averages 64) were performed from this phantom located in the scanner isocenter. The median time interval between these *in vitro* measurements was 8 days. Change point analysis was used to detect break points when shifts in the mean phantom NAA level occurred [17]. On the basis of this method, the monitored time period was divided into five intervals. The mean NAA levels in each of these intervals ranged from 29.07 to 32.15 (arbitrary units). The detected shifts in NAA were used to correct the calibration factor for time-dependent hardware changes.

Preliminary analysis revealed that PCA models constructed for various brain localizations were consistent (i.e., the positions of individual metabolic disorders in the scores plots and the positions of variables in the loadings plots were quite similar). Thus, different brain localizations were included in pooled multivariate analysis.

Although age range in the studied groups is rather narrow, the correction for age-related variation seems to be necessary, because the most rapid metabolic changes are observed during two first years of life [18,19]. This correction was not possible to be performed in the analysis of the whole unresolved spectra, because the individual metabolites are characterized by their specific age-dependent changes. However, to assess the influence of age-related variation on the obtained results, the LCModel derived metabolite levels (Section 2.4) were corrected for age-related changes, and both the corrected and uncorrected results are presented.

Before PCA, the signal intensities were centered by subtraction of their averages.

2.3.2. Principal component analysis

Principal component analysis model of a dataset composed of r observations described by s variables can be expressed as $\mathbf{X}_{[r \times s]} = \mathbf{T}_{[r \times a]} \mathbf{P}_{[s \times a]}^T + \mathbf{E}_{[r \times s]}$, where \mathbf{X} denotes the original data matrix, \mathbf{T} denotes the matrix of principal component scores (coordinates of the observations in the principal components space), \mathbf{P} denotes the matrix of principal component loadings (weights reflecting the contribution of original variables to principal components), \mathbf{E} denotes the matrix of residuals, and a is the number of retained principal components. Thus, the principal component scores are computed as linear combinations of the original variables: $\mathbf{T}_{[r \times a]} = \mathbf{X}_{[r \times s]} \mathbf{P}_{[s \times a]}$.

In this work, PCA model is based on the complete unresolved short TE spectra and as such provides a quick overview of the main sources of variance in the dataset using no a priori knowledge about the metabolites contributing to the spectrum. Age and brain

localization dependent changes in the metabolite levels, subtle changes in the line shapes and peak positions, differences between groups A and B as well as internal variability in these two groups were expected to be responsible for a dominant part of the overall variation in the dataset.

2.3.3. Cross-validation

Every principal component is described by the fraction of the explained variation R^2 . The fraction of the predicted variation Q^2 was determined using seven-fold cross-validation. The

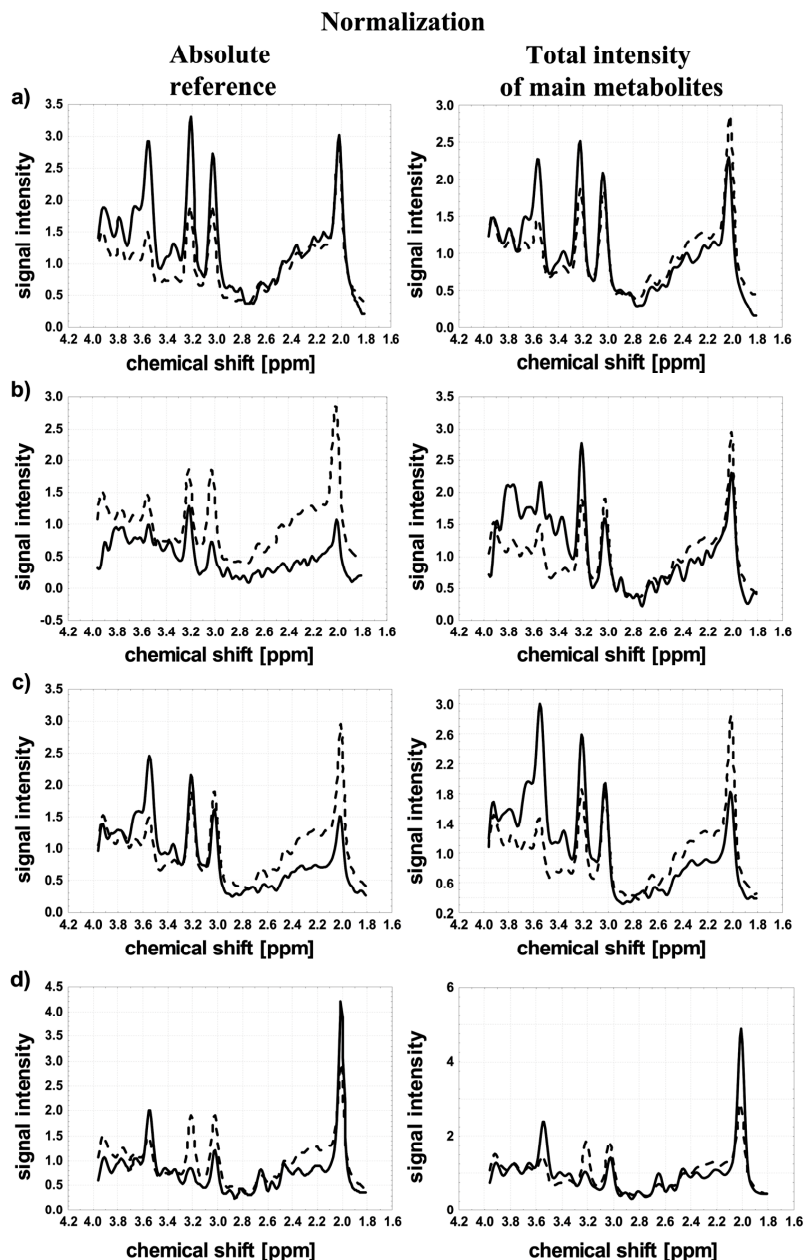


Figure 2. Exemplary spectra (solid lines) presented using two normalization approaches recorded from (a) the left frontal localization in patient 10 diagnosed with globoid leukodystrophy, (b) the right parieto-occipital localization in patient 2 diagnosed with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, (c) the right parieto-occipital localization in patient 4 diagnosed with metachromatic leukodystrophy, (d) the right parieto-occipital localization in patient 6 diagnosed with Canavan disease in comparison with the mean spectrum in group B (dashed line).

cross-validation was exploited as a form of sensitivity analysis. The dataset was divided into seven parts, six of which were used for a model development, and the remaining one was used for evaluation of the predictive ability of the model (Q^2). The prediction error sum of squares is the squared differences between observed and predicted values for the data kept out of the model fitting. The process was repeated until each spectrum was excluded from the model development once. The final prediction error sum of squares then has contributions from all data. If a new component enhances the predictive power, then the new component is considered to be significant.

2.4. Univariate analysis of metabolite levels quantified with LCModel

Univariate analysis of metabolite levels determined with use of LCModel was also performed. LCModel software analyses data under the assumption that ¹H MRS *in vivo* spectrum is a linear combination of the standard metabolite basis set measured *in vitro* [13]. Both the normalization approaches described in Section 2.3.1 were exploited for the sake of comparison between the univariate and multivariate results. The calibration factor used in total signal intensity normalization was obtained based on LCModel-derived metabolite areas.

Cramer–Rao lower bounds computed for each metabolite were used to compare accuracy of spectra quantitation between the disorders belonging to group B and various neurometabolic disorders. The values of these parameters in group B were (mean [standard deviation, SD]): 5.28 (1.11)% for NAA, 4.95 (0.88)% for Cr, 5.18 (1.1)% for Cho, 7.47 (2.11)% for Ins(Gly?), and 9.40 (3.99)% for Glx. The Cramer–Rao lower bounds obtained in group A were compared with these values in group B.

The adjustment for age-related variation was based on a logarithmic regression [18]:

$$L_{\text{obs}} = a \cdot \log A + b \quad (2)$$

(where L_{obs} denotes the observed metabolite level, A denotes patient's age, a and b are constant parameters). The regression lines were fitted separately for frontal, periventricular, and parieto-occipital regions to the metabolite levels measured from

children belonging to group B. Group A was excluded from the analysis of age-related relationships because of severe variations of the metabolite levels not related to age differences. However, the correction computed according to the equation:

$$L_{\text{adj}} = L_{\text{obs}} - a \cdot \log \frac{A}{A_{\text{arb}}} \quad (3)$$

(where L_{adj} denotes the metabolite level corrected for age, A_{arb} denotes arbitrarily chosen age of 22 months) was also applied to this group. The correction was carried out when the relationship between metabolite levels and age was found to be statistically significant ($p < 0.05$).

For univariate evaluation, the metabolite levels measured in group A were converted to the z-scores (z_{obs} is the observed z-score and z_{adj} is the z-score adjusted for age-related variation) according to the formulas:

$$z_{\text{obs}} = \frac{L_{\text{obs}} - \overline{L_{\text{obs}}}}{\sigma_{\text{obs}}} \quad (4)$$

$$z_{\text{adj}} = \frac{L_{\text{adj}} - \overline{L_{\text{adj}}}}{\sigma_{\text{adj}}} \quad (5)$$

where L_{obs} (L_{adj}) denotes the observed (adjusted for age) metabolite level in a patient belonging to group A in a given brain localization, $\overline{L_{\text{obs}}}$ ($\overline{L_{\text{adj}}}$) denotes the mean observed (adjusted for age) metabolite level obtained in the corresponding brain localization in group B, and σ_{mean} (σ_{adj}) denotes the standard deviation of the observed (adjusted for age) metabolite level in group B obtained in the corresponding localization.

Statistical analysis was performed using Statistica software.

3. RESULTS

Figure 2 presents exemplary ¹H MRS *in vivo* spectra obtained in group A in comparison to the mean spectrum measured in group B.

Results obtained from PCA are presented parallelly with findings obtained from LCModel software. Table II shows results of logarithmic regression analysis of the relationships between

Localization	Normalization	Metabolite	Regression line	R ² (%) ^a	p value
F	Absolute reference	Ins(Gly?)	$-0.89 \cdot \log_{10}(A) + 5.46$	8.0	0.012370
		NAA	$0.87 \cdot \log_{10}(A) + 5.36$	12.3	0.001660
		Cho	$-0.29 \cdot \log_{10}(A) + 1.92$	15.2	0.000419
	Total intensity of main metabolites	Ins(Gly?)	$-0.038 \cdot \log_{10}(A) + 0.20$	13.5	0.000915
		NAA	$0.022 \cdot \log_{10}(A) + 0.20$	10.8	0.003334
		Cho	$0.013 \cdot \log_{10}(A) + 0.072$	23.3	0.000008
PO	Absolute reference	NAA	$1.13 \cdot \log_{10}(A) + 5.01$	11.7	0.001779
		Cho	$-0.32 \cdot \log_{10}(A) + 1.78$	17.7	0.000092
	Total intensity of main metabolites	NAA	$0.044 \cdot \log_{10}(A) + 0.18$	23.7	0.000004
		Cho	$-0.01 \cdot \log_{10}(A) + 0.06$	13.2	0.000849
P	Absolute reference	NAA	$1.19 \cdot \log_{10}(A) + 5.16$	21.1	0.001029
		Cho	$-0.40 \cdot \log_{10}(A) + 1.98$	22.1	0.000753
	Total intensity of main metabolites	NAA	$0.043 \cdot \log_{10}(A) + 0.18$	22.6	0.000631
		Cho	$-0.015 \cdot \log_{10}(A) + 0.071$	22.8	0.000607

^aCoefficient of determination.

metabolite levels determined with the use of this software and age. Only statistically significant findings ($p < 0.05$) are presented. NAA and Cho were found to change significantly with age in three evaluated localizations, whereas significant Ins(Gly?) changes were found for frontal localization. The presented regression lines were used for adjustment of age-related changes in metabolite levels determined with the use of LCModel.

3.1. Principal component analysis model of proton magnetic resonance *in vivo* spectra normalized using absolute reference

Figures 3 and 4 show the results of PCA applied to the unresolved spectra calibrated by means of absolute reference. The R^2 and Q^2 values are presented in Table III.

The projection plane formed by two first principal components ($R^2 = 69.9\%$) reveals that the spectra acquired from the patients diagnosed with MLC, MLD, and GLD are clearly separated from the main bulk of data (Figure 3a).

The cases representing MLC were assigned extreme negative PC1 scores mainly because of high positive loadings for NAA, Cr, Cho, and Ins(Gly?) (Figure 4a). The PC1–PC2 projection plane represents 63.7%, 69.8%, 68.1%, and 67.6% of the total variance of these metabolites, respectively (Table III). Table IV presents z-scores for metabolite levels determined with the use of LCModel (both corrected [z_{adj}] and uncorrected for age-related variation [z_{obs}]) for outlying patients in the PCA model. The metabolite levels in group A characterized by Cramer–Rao lower bounds exceeding the threshold “mean + 3 SD” are marked with asterisks in this table. The threshold is determined from data obtained in group B (Section 2.4). It is evident that the Cramer–Rao lower bounds are high in MLC. The levels of NAA and Cr are characterized by the z-scores below -2 SD (both before and after the correction for age-related variation) in this disease. The z-scores for Cho range from -4.75 to -1.53 SD before the correction for age and from -5.0 to -1.01 SD after this correction, whereas the z-scores for Ins(Gly?) range from -3.4 to -0.46 SD before the correction for age and from -3.43 to -0.43 SD after this correction. Thus, diminishment of metabolite levels is directly reflected in high Cramer–Rao lower bounds.

The cases diagnosed with MLD are characterized by low negative PC2 scores mainly because of high positive loadings for NAA and low negative loadings for Ins(Gly?) and Cho (Figures 3a and 4a). Table IV shows that the NAA level is below -2 SD in two patients diagnosed with MLD (patients 4 and 5) both before and after the correction for age-related variation. In patient 3, the NAA z-scores are slightly higher. The z-scores for Cho are above 3 SD in patient 5. In patients 3 and 4, the Cho z-scores range from -0.04 to 1.91 SD before the correction for age and from 0.38 to 2.32 SD after this correction. The Ins(Gly?) level is significantly elevated in patients 3 and 4 (z-scores above 3 SD), whereas in patient 5, the Ins(Gly?) z-scores fall within the range from -1.03 to 0.68 . It is apparent that the results of univariate evaluation of the NAA, Cho, and Ins(Gly?) levels are not consistent among the patients diagnosed with MLD. However, these patients are clustered in the PC1–PC2 projection plane found by PCA (Figure 3a).

The patient diagnosed with GLD is located in the right lower quadrant of the PC1–PC2 plane (Figure 3a). High Ins(Gly?), Cho, and Cr are the characteristic features in this disorder (Figure 4a). Table IV shows that the levels of these metabolites are above 2 SD in this patient.

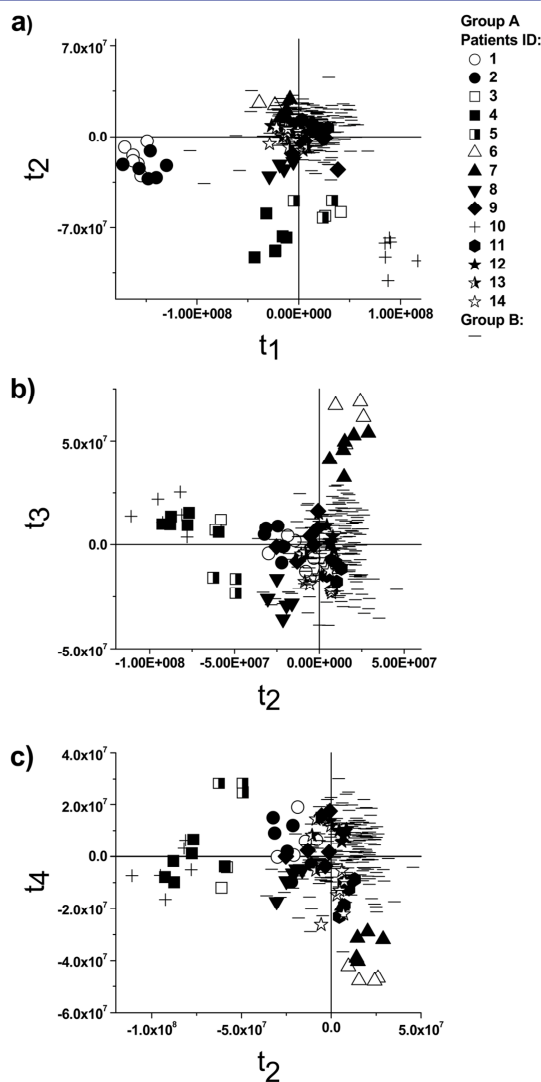


Figure 3. t_1 versus t_2 scores plot (a), t_2 versus t_3 scores plot (b), t_2 versus t_4 scores plot (c) obtained from principal component analysis of the spectra normalized using absolute reference. Patients' diagnosis: 1, 2 – megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts; 3, 4, 5 – metachromatic leukodystrophy; 6, 7 – Canavan disease; 8 – nonketotic hyperglycinemia; 9 – congenital disorders of glycosylation; 10 – globoid leukodystrophy; 11 – ethylmalonic encephalopathy; 12, 13, 14 – mitochondrial cytopathy.

The PC2–PC3 plane ($R^2 = 26.9\%$) shows that CD is characterized by high PC3 scores (Figure 3b). This can be mainly explained by high positive NAA and Ins(Gly?) contributions to PC3 (Figure 4b). The presented plane accounts for 57.5% and 62.4% of the overall variance of these metabolites, respectively (Table III). Table IV shows that the levels of these metabolites are above 2 SD in CD. Figure 3c presents that CD is also characterized by low negative PC4 scores. High positive Cho and Cr contributions are mainly

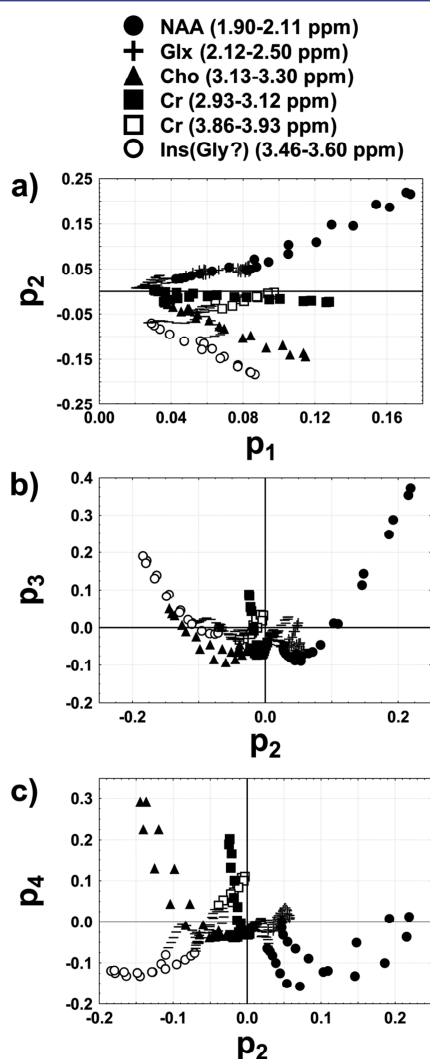


Figure 4. p_1 versus p_2 loadings plot (a), p_2 versus p_3 loadings plot (b), p_2 versus p_4 loadings plot (c) obtained from principal component analysis of the spectra normalized using absolute reference.

responsible for this effect (Figure 4c). The PC2–PC4 plane accounts for 44.9% and 16.3% of the overall variance of these metabolites, respectively (Table III). Table IV shows that the z-scores for Cho are below -2 SD before and after correction for age-related variance (except one localization characterized by slightly higher z-score before the correction). Additionally, it is apparent that Cramer–Rao lower bounds for Cho are high in patient 6. Thus, diminishment of the Cho level is directly reflected in poorer accuracy of quantification in this patient. The z-scores for Cr are in the range from -3.3 to -1.12 SD (Table IV).

Of note, Ins(Gly?) and Cho are located in the distinct areas of the PC2–PC4 loadings plot (Figure 4c). Thus, the separation of patient 5 from the other two patients diagnosed with MLD is shown in this plot. The PC2–PC4 projection plane accounts for 47.1% and 44.9% of Ins(Gly?) and Cho (Table III).

3.2. Principal component analysis model of proton magnetic resonance *in vivo* spectra normalized to total intensity of main metabolites

Figures 5 and 6 show the results of PCA applied to the spectra normalized to the total signal intensity of main metabolites. The R^2 and Q^2 values are presented in Table V.

The projection plane formed by two first principal components ($R^2 = 55.0\%$) reveals that MLD, MLC, and GLD are characterized by low negative PC1 scores (Figure 5a). This is mainly caused by high positive loadings for NAA and low negative loadings for Cho and Ins(Gly?) (Figure 6a). The PC1–PC2 projection plane accounts for 97.9%, 54.4%, and 78.6% of the total variance of these metabolites, respectively (Table V). However, PC1 does not allow for differentiation of these disorders from each other. Table VI presents z-scores for metabolite levels determined with the use of LCModel (both corrected [z_{adj}] and uncorrected for age related variation [z_{obs}]). The NAA level is below -2 SD in MLD and GLD, whereas MLC is characterized by the NAA z-scores ranging from -2.57 to 1.99 SD before the correction for age and from -3.75 to 1.65 SD after the correction. The Ins(Gly?) z-scores in patient 10 diagnosed with GLD and patients 3 and 4 diagnosed with MLD are above 2 SD, whereas in the remaining patient diagnosed with MLD, these z-scores are from -0.77 to 0.38 SD. The Ins(Gly?) z-scores in MLC fall within the range from -2.18 to 4.49 SD before the correction for age and from -2.19 to 4.73 SD after the correction. The Cho level is above 2 SD in patients 4 and 5 diagnosed with MLD both before and after the correction for age (except for one localization in patient 4).

Table III. Principal component analysis model diagnostics (absolute reference normalization)

PC	R^2 ^a (%)	R^2_{cum} ^b (%)	Q^2 ^c (%)	Q^2_{cum} ^d (%)	R^2 NAA ^e (%)	R^2 Cr ^f (%)	R^2 Cho ^g (%)	R^2 Ins(Gly?) ^h (%)
PC1	52.2	52.2	51.9	51.9	40.9	69.1	42.8	26.6
PC2	17.7	69.9	36.8	69.6	22.8	0.8	25.3	41.0
PC3	9.3	79.1	29.4	78.5	34.7	5.8	0.8	21.4
PC4	5.3	84.4	24.5	83.8	0.0	15.6	19.5	6.0

^aFraction of the total variation explained by individual principal components.

^bCumulative fraction of the total variation explained by the extracted principal components.

^cFraction of the total variation that can be predicted by individual components.

^dCumulative fraction of the total variation that can be predicted by the extracted components.

^{e–h}Fractions of the NAA, Cr, Cho, and Ins(Gly?) variations explained by individual principal components.

Table IV. z-scores (SD) for NAA, Cho, Ins(Gly?), Cr, and Glx levels computed for outlying patients in the PCA model of ¹H MRS *in vivo* spectra calibrated by means of absolute reference in frontal right (FR), frontal left (FL), parieto-occipital right (POR), parieto-occipital left (POL), periventricular right (PR), and periventricular left (PL) localizations

Metabolite	Localization	MLC			MLD			CD			GLD		
		Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 10	Patient 7	Patient 6	Patient 10	
NAA	FL	-3.85 (-4.6)*	-5.35 (-5.85)*	-1.55 (-1.89)	-3.91 (-4.39)	na	4.01 (4.73)	4.8 (5.16)	-1.76 (-2.1)	4.01 (4.73)	na	-1.76 (-2.1)	
	FR	-3.38 (-4.1)	-4.9 (-5.37)*	-0.84 (-1.14)	-3.74 (-4.21)	na	5.18 (5.97)	2.74 (2.95)	-0.42 (-0.67)	5.18 (5.97)	na	-0.42 (-0.67)	
	POL	-3.73 (-4.5)*	-3.23 (-3.61)*	na	-3.07 (-3.52)	-2.17 (-2.75)	4.31 (5)	2.49 (2.64)	-0.06 (-0.33)	4.31 (5)	na	-0.06 (-0.33)	
	POR	-3.88 (-4.66)*	-3.95 (-4.38)*	na	-3.49 (-3.97)	-2.84 (-3.46)	3.24 (3.86)	2.06 (2.19)	-0.87 (-1.19)	3.24 (3.86)	na	-0.87 (-1.19)	
	PL	-5.36 (-6.89)*	-5.53 (-6.52)*	na	-3.93 (-4.84)	na	na	3.51 (3.94)	-1.79 (-2.44)	na	na	-1.79 (-2.44)	
	PR	-5.48 (-7.02)*	-5.48 (-6.46)*	na	-4.3 (-5.25)	-4.52 (-5.8)	na	3.72 (4.17)	-1.02 (-1.57)	na	na	-1.02 (-1.57)	
	FL	-2.08 (-1.7)*	-4.75 (-5)*	0.84 (1.18)	1.91 (2.32)	na	-3.27 (-4.06)*	-1.89 (-2.09)	3.35 (3.89)	-3.27 (-4.06)*	na	3.35 (3.89)	
	FR	-2.16 (-1.79)*	-3.39 (-3.52)*	1.72 (2.14)	1.54 (1.91)	na	-3.6 (-4.41)*	-2.24 (-2.47)	4.09 (4.69)	-3.6 (-4.41)*	na	4.09 (4.69)	
	POL	-2.21 (-1.76)*	-1.6 (-1.54)	na	0.91 (1.33)	3.33 (4.23)	-3.85 (-4.77)*	-2.75 (-3.03)	4.05 (4.8)	-3.85 (-4.77)*	na	4.05 (4.8)	
Cho	POR	-1.53 (-1.01)*	-1.84 (-1.8)	na	0.74 (1.14)	4.78 (5.82)	-4.17 (-5.13)*	-2.06 (-2.27)	3.15 (3.81)	-4.17 (-5.13)*	na	3.15 (3.81)	
	PL	-2.47 (-1.92)*	-2.18 (-2.17)*	na	1.61 (2.25)	na	na	-2.57 (-2.89)	5.05 (6.16)	na	na	5.05 (6.16)	
	PR	-3.55 (-3.14)*	-2.79 (-2.86)*	na	-0.04 (0.38)	3.23 (4.39)	2.62 (2.38)	-3.44 (-3.88)	4.2 (5.19)	2.62 (2.38)	na	4.2 (5.19)	
	FL	-0.78 (-0.43)	-3.4 (-3.43)*	3.15 (3.47)	3.5 (3.82)	na	2.4 (2.47)	2.4 (2.47)	4.74 (5.11)	2.4 (2.47)	na	4.74 (5.11)	
	FR	-0.98 (-0.63)	-1.77 (-1.73)	4.16 (4.53)	3.34 (3.65)	na	2.55 (2.31)	2.75 (2.84)	5.67 (6.09)	2.55 (2.31)	na	5.67 (6.09)	
	POL	-1.62*	-1.55	na	4.66	0.68	2.86	2.7	7.44	2.86	na	7.44	
	POR	-0.73	-1.47	na	3.93	0.76	2.16	2.93	6.99	2.16	na	6.99	
	PL	-0.46	-2.72*	na	3.93	3.56	na	3.56	7.73	3.56	na	7.73	
	PR	-1.48*	-3.03*	na	2.87	-1.03	na	3.11	8.46	-1.03	na	8.46	
Cr	FL	-5.11*	-5.76*	0.76	-0.21	na	-3.3	-1.65	2.86	-3.3	na	2.86	
	FR	-5.33*	-5.71*	2.21	-0.26	na	-3.06	-1.12	3.11	-3.06	na	3.11	
	POL	-4.5*	-4.71*	na	-0.46	2.04	-3.06	-2.33	3.5	2.04	na	3.5	
	POR	-2.69*	-4.63*	na	-1.47	1.98	-3.23	-1.6	2.26	-3.23	na	2.26	
	PL	-4.7*	-5.46*	na	-0.44	na	na	-1.94	2.1	-1.94	na	2.1	
	PR	-4.82*	-5.41*	na	-1.95	0.66	na	-2.47	3.28	0.66	na	3.28	
	FL	-3.7*	-2.74	-0.8	-2.19	na	-1.74	-1.53	-0.74	-1.74	na	-0.74	
	FR	-3.18*	-3.46	0.21	-1.42	na	-1.58	-1.42	-0.31	-1.58	na	-0.31	
	POL	-3.86*	-3.14	na	-1.77	1.64	-1.97	-1.3	0.91	1.64	na	0.91	
Glx	POR	-2.69	-3.07	na	-2.34	0.78	-1.31	-0.37	0.57	-1.31	na	0.57	
	PL	-3.47	-3.41	na	-1.28	na	na	-1.65	-0.08	na	na	-0.08	
	PR	-3.34*	-2.82	na	-3.23	0.61	na	-1.15	-0.53	-3.23	na	-0.53	

Both uncorrected z_{obs} and corrected for age z_{adj} (in parentheses) z-scores values are presented. na, not acquired.

*Cramer-Rao lower bounds exceeding the threshold "mean + 3 SD".

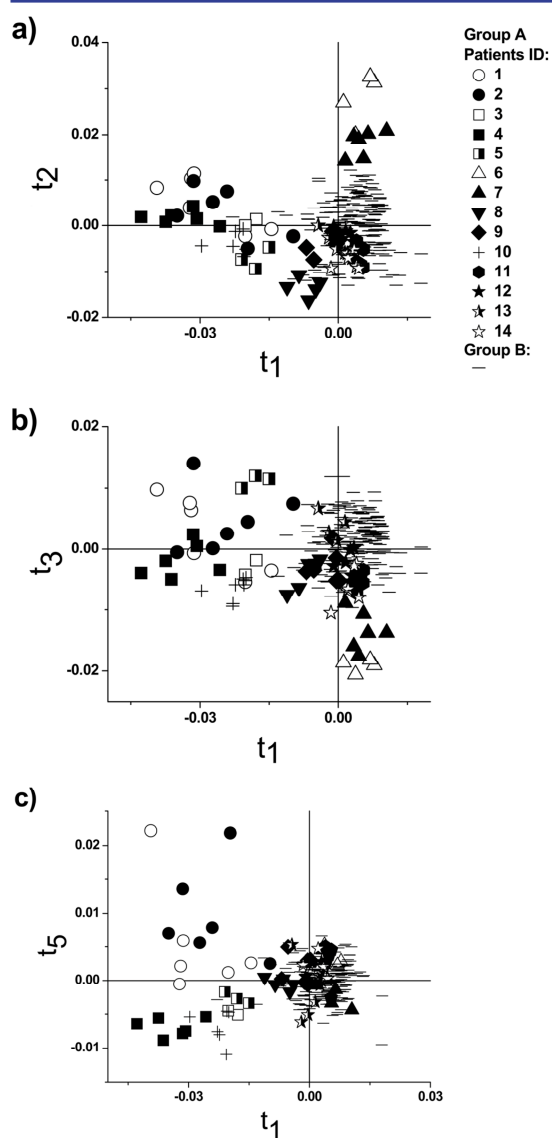


Figure 5. t_1 versus t_2 scores plot (a), t_1 versus t_3 scores plot (b), t_1 versus t_5 scores plot (c) obtained from principal component analysis of the spectra normalized to the total intensity of main metabolites. Patients' diagnosis: 1, 2 – megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts; 3, 4, 5 – metachromatic leukodystrophy; 6, 7 – Canavan disease; 8 – nonketotic hyperglycinemia; 9 – congenital disorders of glycosylation; 10 – globoid leukodystrophy; 11 – ethylmalonic encephalopathy; 12, 13, 14 – mitochondrial cytopathy.

The remaining patient diagnosed with MLD is characterized by lower z-scores for Cho. In MLC, the Cho z-scores fall within the range from -1.61 to 4.09 SD before the correction for age and from -1.64 to 4.96 after the correction. The patient diagnosed with GLD is characterized by the Cho z-scores from 0.74 to 2.69 before the correction for age and from 1.08 to 3.51 after the correction. Thus, it is apparent that it is difficult to differentiate

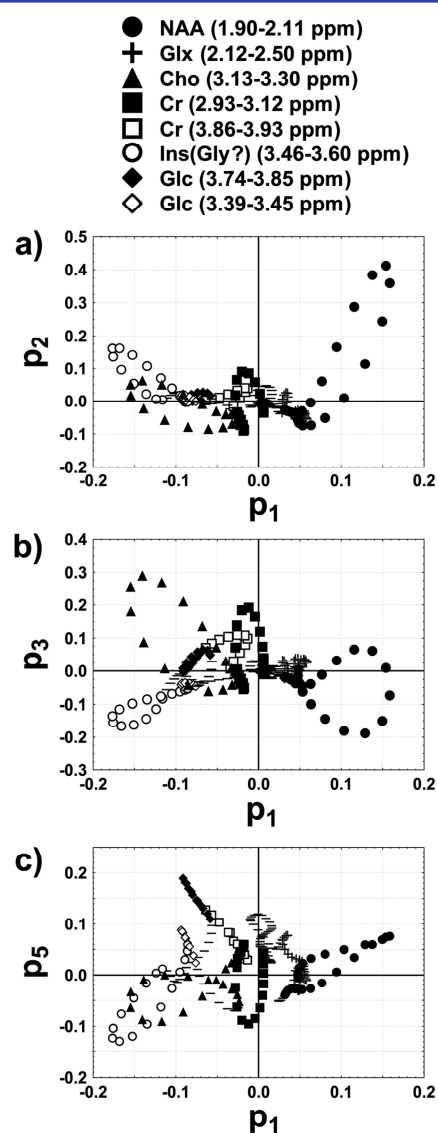


Figure 6. p_1 versus p_2 loadings plot (a), p_1 versus p_3 loadings plot (b), p_1 versus p_5 loadings plot (c) obtained from principal component analysis of the spectra normalized to the total intensity of main metabolites.

MLD, MLC, and GLD from each other based on the NAA, Cho, and Ins(Gly?) levels normalized to total intensity of main metabolites using both the univariate and multivariate analysis.

Canavan disease is characterized by high positive PC2 scores (Figure 5a). This is mainly caused by high positive NAA and Ins(Gly?) contributions (Figure 6a). Table VI shows that NAA z-scores are above 2 SD before and after the correction for age (except one localization characterized by a slightly lower z-score value), and the Ins(Gly?) z-scores are also above 2 SD in CD. The PC1–PC3 projection plane ($R^2 = 46.9\%$) shows also that high positive Cho and Cr contributions to PC3 are responsible for

Table V. Principal component analysis model diagnostics (normalization to total intensity of main metabolites)

PC	R ² ^a (%)	R ² _{cum} ^b (%)	Q ² ^c (%)	Q ² _{cum} ^d (%)	R ² NAA ^e (%)	R ² Cr ^f (%)	R ² Cho ^g (%)	R ² Ins (Gly?) ^h (%)	R ² Glc (3.8 ppm) ⁱ (%)	R ² Glc (3.4 ppm) ^j (%)
PC1	36.9	36.9	36.5	36.5	21.6	3.9	54.1	60.6	54.0	67.7
PC2	18.2	55.0	26.3	53.2	76.3	11.8	0.3	17.9	0.0	0.8
PC3	10.0	65.1	21.0	63.0	0.0	29.5	20.1	12.9	0.0	3.8
PC4	6.6	71.7	18.1	69.7	0.3	29.3	12.7	1.6	0.9	2.0
PC5	4.3	76.0	13.0	73.7	0.6	2.6	0.3	2.5	27.0	7.0

^aFraction of the total variation explained by individual principal components.
^bCumulative fraction of the total variation explained by the extracted principal components.
^cFraction of the total variation that can be predicted by individual components.
^dCumulative fraction of the total variation that can be predicted by the extracted components.
^{e-j}Fractions of the NAA, Cr, Cho, Ins(Gly?), and Glc variations explained by individual principal components.

separation of CD from the rest of the data (Figures 5b and 6b). CD is characterized by low negative PC3 scores. This plane represents 74.1% and 33.4% of the total variance of Cho and Cr, respectively (Table V). Table VI shows that the Cr and Cho z-scores are below -2 SD (except for one localization characterized by slightly higher Cr z-score values) in CD.

Interestingly, separation of MLD and GLD from MLC is evident in the PC1-PC5 projection plane (Figure 5c). The signals corresponding to glucose (Glc) and the children diagnosed with MLC are located in the same quadrants of the loadings and score plots, respectively (Figures 5c and 6c). This projection plane accounts for 81.0% and 74.7% of the total variance of the Glc signal at 3.8 and 3.43 ppm, respectively (Table V). Table VI shows that MLC is characterized by the Glc z-scores above 2 SD. The signal corresponding to Ins(Gly?) and the patients diagnosed with MLD and GLD are located in the same quadrants of the loadings and score plots, respectively, whereas NAA is located in the opposite quadrants (Figures 5c and 6c). Univariate results of Ins(Gly?) and NAA levels in MLD and GLD are mentioned earlier.

4. DISCUSSION

Although ¹H MRS *in vivo* technique has proven its usefulness in biochemical evaluation and treatment monitoring of various pathological processes, its widespread clinical use is observed to be limited. One of the main reasons is the fact that in large spectral datasets, the association of changes seen in many spectroscopic parameters with the established clinical diagnoses poses an interpretation challenge.

In recent years, techniques of automatic extraction of physically meaningful patterns and factors from ¹H MRS *in vivo* datasets incorporating no information about the basis sets have attracted considerable attention. Du *et al.* [20] demonstrated that application of constrained nonnegative matrix factorization in the analysis of chemical shift imaging data proved to be useful in the detection of metabolic abnormalities typical of acute multiple sclerosis lesions in the normal appearing white matter revealing no biochemical disturbances according to standard data analysis. Independent component analysis was shown to be useful in automatic decomposition of data for the purpose of discrimination between tumors characterized by various grades [21]. The potential of PCA in providing features

discriminative for the metastases originating from various primary cancers has also been proven [22].

It is sometimes argued that the interpretation of the components obtained by PCA is not always straightforward because they represent linear combinations of several original variables [23]. Use of independent component analysis could potentially alleviate the problem of contribution of several metabolites to a single component [21], but giving priority to high variance features offered by PCA is very advantageous in case of neurometabolic disorders. It must be emphasized that finding a linear combination of original variables that clusters the spectra representing a given disorder deserves further attention even if interpretation of multivariate results in terms of original variables may be problematic. From a diagnostic point of view, correct classification of cases is sometimes more important than ease of interpretation. That is why the Diagnostic Support Systems are becoming more and more popular.

Apart from utilization of PCA in the evaluation of unresolved spectra, the technique is often applied to the quantified metabolite levels. The first application of the method in neurometabolic disorders was to discriminate between controls, lysosomal, and peroxisomal diseases based on normalized metabolite levels [24]. The study demonstrated the potential of the method in providing a simple means of intuitive visualization of the interspectra relationships in case of small sample size (16 cases of neurometabolic disorders and five controls). In a more recent study examining a larger number of white matter disorders (including neurometabolic ones), supervised linear discriminant analysis of the parameters obtained from ¹H MRS *in vivo* and MRI was used to check the ability of differentiation between the disorders characterized by hypomyelination, demyelination, myelin vacuolation, and cystic degeneration [25]. As opposed to our study, GLD and MLD were a priori grouped into a single class referred to as "demyelination". The same approach was also used in the study of Bizzi *et al.* [3]. Because of its unsupervised nature, PCA exploited in our study did not require any pregrouping of cases. Our data analysis approach was also significantly different from the methods presented in the study of Mahmoodabadi *et al.* [26]. In this work, fuzzy classification of various inborn errors of metabolism relied on a great deal of expertise spectroscopic knowledge about metabolic abnormalities expected to be found in these disorders. Incorporation of such detailed a priori information was to be avoided in our work. One of the common

Table VI. z-scores (SD) for NAA, Cho, Ins(Gly?), Cr, Glx, and Glc levels computed for patients outlying in PCA model of ¹H MRS *in vivo* spectra normalized to total intensity of main metabolites in frontal right (FR), frontal left (FL), parieto-occipital right (POR), parieto-occipital left (POL), periventricular right (PR) and periventricular left (PL) localizations

Metabolite	Localization	MLC			MLD			CD			GLD
		Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 10		
NAA	FL	1.82 (1.47)*	-0.53 (-0.69)*	-2.33 (-2.69)	-4.29 (-4.75)	na	5.67 (6.42)	5.48 (5.83)	-3.44 (-3.85)		
	FR	1.99 (1.65)	0.36 (0.25)*	-2.75 (-3.14)	-4.44 (-4.9)	na	6.44 (7.23)	3.27 (3.49)	-2.7 (-3.07)		
	POL	0.7 (-0.01)*	0.64 (0.46)*	na	-3.68 (-4.6)	-3.58 (-4.77)	5.66 (7.11)	3.19 (3.64)	-2.64 (-3.43)		
	POR	-2.57 (-3.75)*	-1.27 (-1.72)*	na	-3.74 (-4.67)	-4.07 (-5.33)	4.51 (5.8)	1.74 (1.98)	-2.97 (-3.8)		
	PL	-1.84 (-2.97)*	-0.93 (-1.35)*	na	-3.57 (-4.48)	na	na	3.16 (3.58)	-3.27 (-4.15)		
	PR	-1.54 (-2.63)*	-1.28 (-1.75)*	na	-2.49 (-3.26)	-4.21 (-5.52)	na	3.27 (3.71)	-2.79 (-3.61)		
Cho	FL	3.41 (4.62)*	-1.61 (-1.64)*	0.59 (1.03)	3.29 (4.07)	na	-3.19 (-4.3)*	-2.13 (-2.47)	2.01 (2.62)		
	FR	2.35 (3.41)*	1.74 (2.19)*	0.29 (0.69)	2.27 (2.91)	na	-3.64 (-4.82)*	-2.34 (-2.72)	1.79 (2.38)		
	POL	4.09 (4.96)*	3.67 (4.13)	na	1.49 (1.87)	2.01 (2.63)	-3.82 (-4.55)*	-2.77 (-2.97)	0.84 (1.19)		
	POR	2.14 (2.87)*	3.56 (4.01)	na	2.33 (2.77)	3.9 (4.65)	-4.11 (-4.85)*	-2.4 (-2.57)	0.74 (1.08)		
	PL	1.14 (2.2)*	3.16 (3.9)*	na	2.12 (2.85)	na	na	-2.63 (-2.98)	2.69 (3.51)		
	PR	-0.56 (0.26)*	1.29 (1.78)*	na	2.29 (3.04)	3.82 (5.09)	na	-3.48 (-3.95)	1.84 (2.54)		
Ins(Gly?)	FL	3.92 (4.73)	-2.18 (-2.19)*	3.21 (3.7)	5.3 (5.93)	na	3.03 (2.79)	2.24 (2.38)	3.89 (4.42)		
	FR	2.69 (3.41)	2.59 (2.93)	2.98 (3.46)	4.48 (5.05)	na	2.61 (2.33)	2.82 (3)	3.9 (4.43)		
	POL	2.98*	1.82	na	5.46	0	2.78	2.59	3.66		
	POR	2.31	2.32	na	5.97	0.38	2.23	2.23	3.99		
	PL	4.49	0.7*	na	4.87	na	na	3.53	5.38		
	PR	2.93*	-0.39*	na	6.39	-0.77	na	3	5.74		
Cr	FL	-0.93*	-0.41*	0.62	1.64	na	-4.26	-2.71	1.76		
	FR	-2.49*	-1.09*	0.44	0.73	na	-4.28	-1.76	0.79		
	POL	-1.3*	-4.84*	na	0.38	1.96	-6.73	-5.19	0.58		
	POR	1.9*	-3.92*	na	-0.24	3.06	-6.95	-4.49	-0.14		
	PL	-0.89*	-1.27*	na	0.23	na	na	-2.75	-0.16		
	PR	-0.43*	-1.73*	na	0.92	1.72	na	-3.48	0.78		
Glx	FL	-3.7*	2.08	-1.42	-2.73	na	-2.63	-2.67	-1.98		
	FR	-2.31*	-1.85	-0.98	1.68	na	-2.6	-2.35	-1.98		
	POL	-3.68*	-1.5	na	-2.7	1.53	-3.72	-2.47	-1.75		
	POR	-1.26	-0.83	na	-3.13	0.81	-2.3	-2.47	-1.58		
	PL	-1.43	-0.04	na	-1.24	na	na	-2.35	-1.67		
	PR	-0.56*	1.25	na	-2.94	1.49	na	-1.72	-2.28		
Glc	FL	3.52	3.5	-0.22	3.27	na	0.61	-0.89	-0.29		
	FR	3.47	5.29	-0.69	2.07	na	1.78	-0.1	-1.36		
	POL	6.42	6.41	na	0.94	0.17	0.92	-0.76	-0.15		
	POR	4.17	7.09	na	0.14	2.46	1.64	-0.55	-0.27		
	PL	4.09	3.7	na	1.63	na	na	0.64	3.09		
	PR	3.28	2.56	na	0.08	0.69	na	1.21	-0.02		

Both uncorrected z_{obs} and corrected for age z_{adj} (in parentheses) z-scores values are presented.

na, not acquired.

*Cramer-Rao lower bounds exceeding the threshold "mean + 3 SD".

features of our paper and the aforementioned ones [3,25,26] is an attempt to construct mathematical classification models of rare disorders as opposed to the articles presenting just single or multiple cases studies. The latter type of the papers is prevalent. As spectroscopic abnormalities in several neurometabolic disorders were shown to be very prominent, some of these papers will be referenced despite lack of a "typical" control group in our study.

$^1\text{H MRS in vivo}$ is a valuable source of disease-specific or process-specific biochemical information in neurometabolic disorders. The examples of disease-specific abnormalities are NAA and NAA/Cr increases in CD caused by aspartoacylase deficiency hydrolyzing NAA to acetate and aspartate [4,27]. The NAA level has been shown to be decreased in various disorders characterized by neuronal and/or axonal loss and dysfunction [28]. This metabolite is considered to be a neuroaxonal marker, although it was also expressed by oligodendrocytes [29]. The exact biochemical role of NAA is not fully understood. However, it is believed to serve as an acetyl group donor in lipid synthesis [28]. Thus, reduced aspartoacylase activity and an increased NAA level may reflect disturbances in normal myelination process. Indeed, decreased lecithin and sphingomyelin content of white matter was found in this disease [30]. This probably corresponds to low Cho observed in the cases diagnosed with CD [4]. Another metabolite shown to be altered in CD is Ins [31]. This metabolite is considered to be a marker of glial cells. A high Ins level in CD corresponds to gliosis. Interestingly, the trends in the NAA, Ins(Gly?), Cho, and Cr changes were found to be similar in both the normalization approaches.

Twenty years ago, Kruse *et al.* [32] believed that Ins can play a specific role in the pathophysiology of MLD. As more and more spectroscopic studies were conducted, it became evident that elevation of this metabolite is a common feature of various leukoencephalopathies [31]. In our dataset, both MLD (two of three cases) and GLD are characterized by the increased Ins(Gly?) levels, as shown using two normalization approaches. Additionally, the abnormal Cho levels are observed in some spectra measured from MLD and GLD. The common feature of these diseases is demyelination, and Ins and Cho are considered to be myelin breakdown products. In the PCA model of the spectra normalized based on the absolute reference, the second principal component seems to be especially important for differentiation of MLD from other disorders because both Ins(Gly?) and Cho reveal a significant contribution to this component. Additionally, secondary neuroaxonal loss occurring in demyelinating disorders is reflected by this component. Despite univariate differences in the NAA, Cho, and Ins levels among three patients diagnosed with this disease, clustering of the spectra measured from MLD along PC2 was observed. In our analysis, this component seems to be more diagnostically useful than individual metabolite levels.

Although no a priori information about similarity of GLD and MLD was used in the development of PCA models, our results indicate that the metabolic patterns obtained by $^1\text{H MRS in vivo}$ in these two demyelinating disorders are rather consistent. It is not possible to distinguish GLD from MLD in the PCA model of the spectra normalized to the total intensity of main metabolites. Additionally, GLD and MLD are situated quite close to each other in the PC1–PC2 plot in the PCA model of spectra calibrated using absolute reference. The findings obtained by Brockmann *et al.* [33] and Zariffi *et al.* [34] are in agreement with our conclusions.

Development of subcortical cysts and white matter swelling are characteristic MRI abnormalities found in MLC [2]. Although no metabolic defect was identified in this condition, $^1\text{H MRS in vivo}$ proved to be useful in evaluation of this disorder. A

common finding in an abnormally appearing white matter of the patients diagnosed with MLC is a decrease in the levels of all evaluated metabolites leading to a complete disappearance of the metabolite signals in the most severe course of the disease [35,36]. This effect is shown in the PCA model of the spectra normalized based on absolute reference and could be explained by increased water content. Changes in the residual metabolic pattern were studied using normalization to the total intensity of main metabolites. Considerably increased Ins(Gly?) and Cho in several spectra acquired from children diagnosed with this disease could be explained by gliosis and demyelination [12]. Interestingly, increased Glc levels in MLC were also shown using this normalization. This metabolic abnormality was shown to be characteristic of brain swelling [37].

The directions of the largest variation in the dataset are not suitable for discrimination of EE, MC, NKH, and CDG from the disorders belonging to group B. Of note, this is the first study presenting the application of short TE $^1\text{H MRS in vivo}$ to evaluation of brain metabolism in EE. Grosso *et al.* [38] used chemical shift imaging technique to acquire long TE spectra from basal ganglia in this disorder. The main result of this study was Lac increase in this brain area. Although the spectral region characteristic for Lac was excluded from the main PCA analysis, we determined Lac level from the long TE $^1\text{H MRS in vivo}$ spectra. We obtained that Lac does not appear in the spectra acquired from white matter in EE. This metabolite was not shown to be increased in MC either. When interpreting the results, one should take into account that in MC, spatial heterogeneity of Lac and the temporal variations of this metabolite level are observed [11]. It can be expected that diagnostic sensitivity could be increased by applying an MRI-guided technique in MRS localization and by taking into account individual patient's clinical history, but for the sake of consistency of the dataset, the spectra were acquired from the same localizations in all patients. Spatial heterogeneity of biochemical disturbances was also observed in CDG syndrome. Takeuchi *et al.* [39] found metabolic abnormalities in cerebellum to be more pronounced than in parietal white matter.

One of the major limitations of the study is a relatively small number of cases representing the discussed neurometabolic diseases. It must be stressed that in these diseases, the profiles obtained by $^1\text{H MRS in vivo}$ are dependent on timing of examination relative to the disease stage and age at onset of symptoms. Brockmann *et al.* [33] found significant differences in the metabolite levels and ratios between infantile, juvenile, and adult forms of GLD. In mitochondrial diseases, Lac is more commonly detected during the periods of exacerbation of symptoms [11]. However, it should be emphasized that single cases of individual neurometabolic disorders are described both by the authors using traditional univariate statistics [12] and by the authors trying to develop sophisticated classification systems [26]. Rarity of individual neurometabolic disorders makes PCA models constructed based on single cases valuable sources of clinically useful information [40]. As spectra from a larger number of neurometabolic cases are difficult to be collected in a single institution, a technique of data structure visualization was required to be unsupervised. Natural clustering of patients in the scores plots unbiased from any diagnostic information was paid attention to.

As spectroscopic dataset acquired from healthy, age-matched children is not available in our institution, treating the spectra corresponding to a disturbed metabolism (global developmental delay, cerebral palsy, and epileptic encephalopathy) as the

reference points in a model interpretation may result in an incomplete understanding of the underlying pathophysiology of the presented rare diseases. However, it must be stressed that differentiation of these diseases from a variety of other neurological disorders closely resembles the diagnostic problem to be solved by many clinicians in everyday practice and is very important from a diagnostic point of view. The primary aim of this work was not focused on a detailed characterization of spectroscopic abnormalities in neurometabolic disorder group but on differentiation of these disorders from a heterogeneous group of other neurological disorders.

Rarity of inborn errors of metabolism makes researchers study biochemical abnormalities in the groups of patients characterized by wide age ranges. Van der Voorn *et al.* studied patients aged from 8 months to 34 years and performed correction of the LCModel derived metabolite levels for age-related variation [25]. However, spectroscopic data from healthy children (especially those under 2 years old) are not always available, and it is difficult to obtain reliable models of age-related changes. Various disorders may be characterized by different patterns of these changes. Bizzi *et al.* [3] did not find interaction between metabolite ratios and age in their group of patients aged from 8 months to 17 years. The age was not included in their linear discriminant analysis model. However, several misclassifications could be explained by a lack of correction for age-related variation. The PCA models presented in our work show that age-related changes were not the largest source of variability in the dataset. The directions of the largest variation were dominated by several neurometabolic disorders (MLD, GLD, MLC, and CD). This conclusion seems to be very important from a practical point of view.

Although a small number of cases representing individual neurometabolic disorders may prevent from drawing definitive conclusions about the degree of variability of the metabolite levels in these disorders, the overall size of the dataset (278 short TE spectra) is one of the major strengths of the study. Automatic analysis of this data without employment of the basis set of the signals expected to occur in the spectra is also considered to be of great value. It is very advantageous because the definition of complete basis sets in metabolic disorders is not straightforward. For example, in deficiency of complex II of mitochondrial respiratory chain, the appearance of a characteristic succinate signal at 2.4 ppm can be mentioned [7]. Similarly, in galactosemia, a specific peak at 3.7 ppm corresponding to galactitol occurs [12]. These metabolites are usually not included in the standard basis sets.

Summarizing, this work proved that ¹H MRS *in vivo* coupled with PCA is an efficient tool in the visualization of differences between several neurometabolic (MLD, GLD, MLC, and CD) and other neurological disorders. The main future direction of research is an extension of the developed models by incorporating new cases diagnosed both with and without neurometabolic disorders. This would enable to check the external validity of the developed models. The final aim would be to use the created models to predict (or narrow) the diagnosis for unknown cases.

REFERENCES

- Applegarth DA, Toone JR, Lowry RB. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969–1996. *Pediatrics*. 2000; **105**: e10.
- Barkovich AJ. An approach to MRI of metabolic disorders in children. *J Neuroradiol*. 2007; **34**: 75–88.
- Bizzi A, Castelli G, Bugiani M, Barker PB, Herskovits EH, Danesi U, Erbetta A, Moroni I, Farina L, Uziel G. Classification of childhood white matter disorders using proton MR spectroscopic imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008; **29**: 1270–5.
- Wittsack HJ, Kugel H, Roth B, Heindel W. Quantitative measurements with localized 1H MR spectroscopy in children with Canavan's disease. *J Magn Reson Imaging*. 1996; **6**: 889–93.
- Choi CG, Lee HK, Yoon JH. Localized proton MR spectroscopic detection of nonketotic hyperglycinemia in an infant. *Korean J Radiol*. 2001; **2**: 239–42.
- Dezortova M, Jiru F, Petrasek J, Malinova V, Zeman J, Jirsa M, Hajek M. 1H MR spectroscopy as a diagnostic tool for cerebral creatine deficiency. *MAGMA*. 2008; **21**: 327–32.
- Brockmann K, Bjornstad A, Dechent P, Korenke CG, Smeitink J, Trijbels JM, Athanassopoulos S, Villagran R, Skjeldal OH, Wilichowski E, Frahm J, Hanefeld F. Succinate in dystrophic white matter: a proton magnetic resonance spectroscopy finding characteristic for complex II deficiency. *Ann Neurol*. 2002; **52**: 38–46.
- Menze BH, Lichy MP, Bachert P, Kelm BM, Schlemmer HP, Hamprecht FA. Optimal classification of long echo time *in vivo* magnetic resonance spectra in the detection of recurrent brain tumors. *NMR Biomed*. 2006; **19**: 599–609.
- Axelsson D, Bakken IJ, Gribbestad IS, Ehrnholm B, Nilsen G, Aasly J. Applications of neural network analyses to *in vivo* 1H magnetic resonance spectroscopy of Parkinson disease patients. *J Magn Reson Imaging*. 2002; **16**: 13–20.
- Jolliffe IT. *Principal component analysis*, (2nd edn). Springer Verlag: New York, 2000.
- Bianchi MC, Tosetti M, Battini R, Manca ML, Mancuso M, Cioni G, Canapicchi R, Siciliano G. Proton MR spectroscopy of mitochondrial diseases: analysis of brain metabolic abnormalities and their possible diagnostic relevance. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2003; **24**: 1958–66.
- Cakmakci H, Pekcevik Y, Yis U, Unalp A, Kurul S. Diagnostic value of proton MR spectroscopy and diffusion-weighted MR imaging in childhood inherited neurometabolic brain diseases and review of the literature. *Eur J Radiol*. 2010; **74**: e161–71.
- Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized *in vivo* proton NMR spectra. *Magn Reson Med*. 1993; **30**: 672–9.
- Klose U. *In vivo* proton spectroscopy in presence of eddy currents. *Magn Reson Med*. 1990; **14**: 26–30.
- Devos A, Lukas L, Suykens JA, Vanhamme L, Tate AR, Howe FA, Majós C, Moreno-Torres A, van der Graaf M, Arús C, van Huffel S. Classification of brain tumours using short echo time 1H MR spectra. *J Magn Reson*. 2004; **170**: 164–75.
- Michaelis T, Merboldt KD, Bruhn H, Hänicke W, Frahm J. Absolute concentrations of metabolites in the adult human brain *in vivo*: quantification of localized proton MR spectra. *Radiology*. 1993; **187**: 219–27.
- Taylor W. Change-point analysis: a powerful new tool for detecting changes. 2010. <http://www.variation.com/cpa/tech/changepoint.html>
- Hashimoto T, Tayama M, Miyazaki M, Fujii E, Harada M, Miyoshi H, Tanouchi M, Kuroda Y. Developmental brain changes investigated with proton magnetic resonance spectroscopy. *Dev Med Child Neurol*. 1995; **37**: 398–405.
- Kreis R, Ernst T, Ross BD. Development of the human brain: *in vivo* quantification of metabolite and water content with proton magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med*. 1993; **30**: 424–37.
- Du S, Mao X, Sajda P, Shungu DC. Automated tissue segmentation and blind recovery of (1)H MRS imaging spectral patterns of normal and diseased human brain. *NMR Biomed*. 2008; **21**: 33–41.
- Hao J, Zou X, Wilson MP, Davies NP, Sun Y, Peet AC, Arvanitis TN. A comparative study of feature extraction and blind source separation of independent component analysis (ICA) on childhood brain tumour 1H magnetic resonance spectra. *NMR Biomed*. 2009; **22**: 809–18.
- Sjøbakk TE, Johansen R, Bathen TF, Sonnewald U, Kvistad KA, Lundgren S, Gribbestad IS. Metabolic profiling of human brain metastases using *in vivo* proton MR spectroscopy at 3T. *BMC Cancer*. 2007; **7**: 141.
- González-Navarro FF, Belanche-Muñoz LA, Romero E, Vellido A, Julià-Sapè M, Arús C. Feature and model selection with discriminatory visualization for diagnostic classification of brain tumours. *Neurocomputing*. 2002; **23**: 622–632.
- Chabrol B, Salvan AM, Confort-Gouny S, Vion-Dury J, Cozzone PJ. Localized proton magnetic resonance spectroscopy of the brain

- differentiates the inborn metabolic encephalopathies in children. *C R Acad Sci III*. 1995; **318**: 985–92.
25. van der Voorn JP, Pouwels PJ, Hart AA, Serrarens J, Willemsen MA, Kremer HP, Barkhof F, van der Knaap MS. Childhood white matter disorders: quantitative MR imaging and spectroscopy. *Radiology*. 2006; **241**: 510–7.
 26. Mahmoodabadi SZ, Alirezaie J, Babyn P, Kassner A, Widjaja E. Wavelets and fuzzy relational classifiers: A novel spectroscopy analysis system for pediatric metabolic brain diseases. *Fuzzy sets and systems*. 2010; **161**: 75–95.
 27. Grodd W, Krageloh-Mann I, Klose U, Sauter R. Metabolic and destructive brain disorders in children: findings with localized proton MR spectroscopy. *Radiology*. 1993; **181**: 173–181.
 28. Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri AM. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol*. 2007; **81**: 89–131.
 29. Bhakoo KK, Pearce D. In vitro expression of N-acetyl aspartate by oligodendrocytes: implications for proton magnetic resonance spectroscopy signal in vivo. *J Neurochem*. 2000; **74**: 254–62.
 30. Kamoshita S, Rapin I, Suzuki K, Suzuki K. Spongy degeneration of the brain. A chemical study of two cases including isolation and characterization of myelin. *Neurology*. 1968; **18**: 975–85.
 31. Cecil KM. MR spectroscopy of metabolic disorders. *Neuroimaging Clin N Am*. 2006; **16**: 87–116.
 32. Kruse B, Hanefeld F, Christen HJ, Bruhn H, Michaelis T, Hänicke W, Frahm J. Alterations of brain metabolites in metachromatic leukodystrophy as detected by localized proton magnetic resonance spectroscopy in vivo. *J Neurol*. 1993; **241**: 68–74.
 33. Brockmann K, Dechent P, Wilken B, Rusch O, Frahm J, Hanefeld F. Proton MRS profile of cerebral metabolic abnormalities in Krabbe disease. *Neurology*. 2003; **60**: 819–25.
 34. Zariifi MK, Tzika AA, Astrakas LG, Poussaint TY, Anthony DC, Darras BT. Magnetic resonance spectroscopy and magnetic resonance imaging findings in Krabbe's disease. *J Child Neurol*. 2001; **16**: 522–6.
 35. Mejaski-Bosnjak V, Besenski N, Brockmann K, Pouwels PJ, Frahm J, Hanefeld FA. Cystic leukoencephalopathy in a megalencephalic child: clinical and magnetic resonance imaging/magnetic resonance spectroscopy findings. *Pediatr Neurol*. 1997; **16**: 347–50.
 36. Miles L, DeGrauw TJ, Dinopoulos A, Cecil KM, van der Knaap MS, Bove KE. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: a third confirmed case with literature review. *Pediatr Dev Pathol*. 2009; **12**: 180–6.
 37. Ricci R, Bacci A, Tugnoli V, Battaglia S, Maffei M, Agati R. Metabolic findings on 3T 1H-MR spectroscopy in peritumoral brain edema. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007; **28**: 1287–91.
 38. Grosso S, Balestri P, Mostardini R, Federico A, De Stefano N. Brain mitochondrial impairment in ethylmalonic encephalopathy. *J Neurol*. 2004; **251**: 755–6.
 39. Takeuchi M, Harada M, Hisaoka S, Nishitani H, Mori K, Sakama M. Magnetic resonance imaging and proton MR spectroscopy of the brain in a patient with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *J Magn Reson Imaging*. 2003; **17**: 722–5.
 40. Pan Z, Gu H, Talaty N, Chen H, Shanaiah N, Hainline BE, Cooks RG, Raftery D. Principal component analysis of urine metabolites detected by NMR and DESI-MS in patients with inborn errors of metabolism. *Anal Bioanal Chem*. 2007; **387**: 539–49.

10 Tekst publikacji A.3

JOURNAL OF APPLIED CLINICAL MEDICAL PHYSICS, VOLUME 15, NUMBER 3, 2014

Four-and-one-half years' experience in monitoring of reproducibility of an MR spectroscopy system — application of *in vitro* results to interpretation of *in vivo* data

Agnieszka Skorupa,^{1a} Magdalena Wicher,² Tomasz Banasik,^{3,4}
Ewa Jamroz,⁵ Justyna Paprocka,⁵ Aleksandra Kieltyka,⁴ Maria Sokół,¹
Marek Konopka²

Department of Medical Physics,¹ Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice, Poland; Scanx Medical Imaging Sp. z o.o.,² Katowice, Poland; Henryk Niewodniczański Institute of Nuclear Physics,³ Polish Academy of Sciences, Kraków, Poland; Helimed Diagnostic Imaging Sp. z o.o.,⁴ Katowice, Poland; Child Neurology Department,⁵ Silesian Medical University, Katowice, Poland
askorupa@io.gliwice.pl

Received 14 October, 2013; accepted 29 January, 2014

The primary purpose of this work was to assess long-term *in vitro* reproducibility of metabolite levels measured using ¹H MRS (proton magnetic resonance spectroscopy). The secondary purpose was to use the *in vitro* results for interpretation of ¹H MRS *in vivo* spectra acquired from patients diagnosed with Canavan disease. ¹H MRS measurements were performed in the period from April 2006 to September 2010. 118 short and 116 long echo spectra were acquired from a stable phantom during this period. Change-point analysis of the *in vitro* N-acetylaspartate levels was exploited in the computation of f_T factor (ratio of the actual to the reference N-acetylaspartate level normalized by the reciprocity principle). This coefficient was utilized in the interpretation of *in vivo* spectra analyzed using absolute reference technique. The monitored time period was divided into six time intervals based on short echo *in vitro* data (seven time intervals based on long echo *in vitro* data) characterized by f_T coefficient ranging from 0.97 to 1.09 (based on short echo data) and from 1.0 to 1.11 (based on long echo data). Application of this coefficient to interpretation of *in vivo* spectra confirmed increased N-acetylaspartate level in Canavan disease. Long-term monitoring of an MRS system reproducibility, allowing for absolute referencing of metabolite levels, facilitates interpretation of metabolic changes in white matter disorders.

PACS numbers: 87.19.lf, 87.61.Tg, 87.64.K-, 87.64.kj

Key words: magnetic resonance spectroscopy, reproducibility, Canavan disease

I. INTRODUCTION

¹H MRS *in vivo* has many important applications in the study of human brain biochemistry. In recent years our group utilized this technique in the evaluation of metabolic changes in various neurological disorders in children (including neurometabolic ones).⁽¹⁾ As neurometabolic disorders individually are extremely rare, it was necessary to pool the data acquired during a relatively long period of time. Thus, long-term reproducibility of the technique was of crucial importance to provide information about its sensitivity. As it has already been shown, reproducibility depends on the quantification method used.⁽²⁾

^a Corresponding author: Agnieszka Skorupa, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Department of Medical Physics, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice, Poland; phone: +48 32 278 80 47; fax: +48 32 278 80 71; email: askorupa@io.gliwice.pl

^1H MRS *in vivo* is often claimed to be a quantitative technique; however, absolute metabolite level quantification is not straightforward. In the normal brain, water content and relaxation properties of the water molecules are known — thus, the water signal can be used as an internal standard in the calculations of metabolite concentrations.⁽³⁾ In such an approach, several sources of error (such as B1 inhomogeneity, changes in coil loading conditions, changes in hardware performance) are eliminated; however, in the case of the diseased brain, accurate referencing to brain water is quite complex. Because water relaxation times have been shown to change in many neurometabolic disorders, it could be misleading to scale the metabolite levels accordingly to not fully relaxed water signal, as some researchers have done in application to long TE spectra from tumors⁽⁴⁾ or from white matter hyperintensities in the elderly.⁽⁵⁾ However, T2 measurements are required to be elaborate enough to account for compartmentation of water into several pools of different spin-spin relaxation times (in the normal brain: cerebrospinal fluid, extra/intracellular water, myelin water).⁽⁶⁾ Interestingly, the number of these pools may increase in the pathologic brain.⁽⁷⁾ Apart from changes in water relaxation properties, the water content is subject to change in many neurometabolic disorders. Although the signal corresponding to the respective water compartments could be referenced to the signal from an external standard located next to the patient's head, this method is valid only under the assumption of negligible B1 changes between these two measurement locations.⁽⁸⁾

In the absolute standard quantification technique, the *in vivo* metabolite levels are referenced to the *in vitro* signals acquired during an independent measurements session from a phantom with a known content located centrally in the coil. However, B1 inhomogeneity, time-dependent hardware changes, and variations in coil loading conditions should be taken into consideration.⁽⁸⁾

The importance of phantom measurements has already been recognized in ^1H MRS quality control procedures devoted to establishment of reproducibility of the technique.⁽⁹⁻¹³⁾ Although the results of these measurements cannot be directly translated to *in vivo* conditions, it is usually more practical to assess reproducibility under ideal conditions. Many sources of variability inherent to *in vivo* measurements are eliminated using phantoms, yet time dependent changes in the scanner performance are easier to detect in *in vitro* conditions. Moreover, the results from *in vitro* experiments can be used to correct *in vivo* data for the detected instability.⁽¹²⁾

The primary aim of this work was to assess long-term *in vitro* reproducibility of metabolite levels obtained using ^1H MRS. Traditionally, results of reproducibility monitoring of MRS systems are expressed using coefficients of variations^(10,11) or are presented using traditional control charts.⁽¹²⁾ We propose application of a change-point analysis⁽¹⁴⁾ to detect break points when significant changes in the performance of MRS system occur. Since the phantom measurements were performed as a part of quality assurance program in ^1H MRS *in vivo* studies of neurological disorders, the secondary aim of this work was to utilize the *in vitro* results in the retrospective interpretation of *in vivo* data.

II. MATERIALS AND METHODS

A. ^1H MRS

^1H MRS measurements were performed over the time period from April 2006 to September 2010 on a 1.5T GE scanner (GE Healthcare, Waukesha, WI) equipped with a transmit/receive head coil.

A.1 ^1H MRS in the studies of neurological disorders in children

The studied children were admitted for etiologic diagnostic evaluation (or diagnosis verification) because of the suspicion of neurometabolic disorder due to clinical features or abnormal laboratory results. Based on detailed metabolic and neuroimaging screening, several patients were diagnosed with neurometabolic disorders.⁽¹⁾ In this work we present the results obtained from two children diagnosed with Canavan disease (case 1 aged 8 months and case 2 aged

18 months) and 46 children (median age: 24 months, age range: 2–47 months) diagnosed with other neurological disorders (epilepsy, developmental delay, and cerebral palsy).

Both water suppressed and water unsuppressed spectra were recorded. The acquisition parameters were as follows: TE 35 and 144 ms, TR 1500 ms, volume of interest: 8 ml, bandwidth 2500 Hz, samples 2048, number of signal averages: 128 (for water suppressed spectra) and 16 (for water unsuppressed ones), localization sequence: PRESS. We intended to measure six spectra for each TE from the volumes of interest located bilaterally in the frontal, periventricular (laterally to the ventricles) and in parieto-occipital areas. Due to motion of the patients and time constraints, the number of brain localizations examined was reduced in some patients. This number ranged from one to six for each TE. The spectra measured from all localizations were pooled in the analysis.

LCModel software analyzes ^1H MRS *in vivo* spectra as linear combinations of individual metabolites *in vitro* spectra (basis set).⁽¹⁵⁾ The basis set used in this work was measured at another site and was provided with the software. We focused on the N-acetylaspartate (NAA) level determined separately for short and long TE using absolute standard calibration. In this method, the measured *in vivo* spectra are multiplied by f_{scale} factor:

$$f_{\text{scale}} = f_{\text{tra}} \cdot f_{\text{gain}} \cdot f_{\text{calib}} \cdot f_t \cdot \frac{1}{V} \quad (1)$$

The coefficient $f_{\text{tra}} = 10^{0.005 \cdot (TG - 65)}$ (where TG denotes transmitter gain) is related to the principle of reciprocity (higher coil loading requires higher TG for 90° excitation which results in a lower signal intensity received from the same number of protons) and is used for coil loading correction.^(16,17) TG was set automatically during preset procedures.

The coefficient $f_{\text{gain}} = 2^{(6 - \frac{R1}{2}) + (30 - R2)}$ (where R1 and R2 denote digital and analogue receiver gains, respectively) is used for receiver gain correction.

The coefficient $f_{\text{calib}} = \frac{c_{\text{true}}}{c_{\text{lcm}}}$ (where c_{true} denotes true metabolite concentration in the phantom, while c_{lcm} denotes the metabolite level output by LCModel (adjusted for the voxel size, TG – using f_{tra} , R1 and R2 – using f_{gain})) is used to correct for scaling differences between the basis set and *in vivo* data. According to the LCModel manual, NAA was dissolved in the standard solvent (1 mM TSP, 72 mM K_2HPO_4 , 28 mM KH_2PO_4 , 200 mM sodium formate, 1g/L NaN_3) and a reference spectrum was measured from the phantom located centrally in the coil.⁽¹⁸⁾ This measurement was performed on 16 November 2007.

The coefficient f_t accounts for changes in the temporal setup of the scanner. This coefficient may change suddenly (for example, after breakdown of the system, after replacement of hardware parts, after parameters readjustment) or gradually (for example, as hardware parts wear down). Determination of f_t factor is described in Material and Methods section A.2 below.

V denotes voxel size.

No correction for T1 metabolite relaxation and for differences between *in vivo* and *in vitro* relaxation times was performed in the absolute reference technique.

Since water signal intensity is susceptible to pathological white matter changes, the NAA levels obtained with a water scaling technique are presented to show the shortcomings of using nonfully relaxed water signal as a reference in neurometabolic disorders. In this technique the measured spectra are multiplied by f_{scale} factor according to the equation:⁽¹⁸⁾

$$f_{\text{scale}} = \frac{\text{Area}_{\text{met}}}{\text{NHMET} \cdot \text{Conc}_{\text{met}}} \cdot \frac{2 \cdot \text{Conc}_{\text{water}} \cdot \text{ATT}_{\text{water}}}{\text{Area}_{\text{water}}} \quad (2)$$

where $Area_{met}$ and $Conc_{met}$ are the observed resonance areas and concentrations of the selected singlet in the basis set (by default, corresponding to the methyl (CH_3) groups of creatine); $NIHMET$ is the number of equivalent protons contributing to this singlet; and $Area_{water}$, $Conc_{water}$, and ATT_{water} are the observed resonance areas, concentration (35.8 M) and attenuation factor of water signal due to transverse relaxation with $T_2 = 80$ ms. Of note, the assumed values for $Conc_{water}$ and ATT_{water} relate to normal adult brain, and accurate values were not determined individually for each patient. No correction for T_1 metabolite and water relaxation and for differences between *in vivo* and *in vitro* metabolite relaxation times was performed in water scaling technique.

The results obtained for Canavan disease were compared to those obtained in other neurological disorders by means of z-scores computed according to the formula:

$$z = \frac{m - m_{mean}}{m_{\sigma}} \quad (3)$$

where m denotes the NAA level observed in Canavan disease, m_{mean} denotes the mean NAA level obtained in other neurological disorders, and m_{σ} denotes standard deviation of the NAA level in other neurological disorders. To minimize the influence of age-dependent NAA changes, the z-scores for case 1 were calculated using the mean and standard deviation computed for children aged from 2 to 12 months, while the z-scores for case 2 were obtained using the mean and standard deviation computed for children aged from 12 to 24 months. Differences characterized by the z-scores lower than -2.0 SD or higher than 2.0 SD were considered to be statistically significant. Age-matching was mandatory because age-related variation is an important source of the total variance in MRS studies in young children.^(19,20)

Direct comparison of NAA levels between CD and other neurological disorders is motivated by uniqueness of NAA changes observed in CD. While most pathological conditions (such as ischemia, brain injury, brain cancer or multiple sclerosis) are characterized by decreased NAA or NAA-to-Cr ratio, CD involves accumulation of NAA in the brain.⁽²¹⁾ Although comparison of the NAA levels in CD to those observed in healthy children would provide a better insight into the pathophysiology of CD, spectroscopic datasets acquired from healthy, age-matched children are difficult to obtain due to ethical reasons.

A.2 Determination of the coefficient f_T

A standard spherical brain phantom provided by the manufacturer was used for long-term reproducibility studies. The phantom contains: 12.5 mM NAA, 10 mM creatine (Cr), 3 mM choline (Cho), 7.5 mM myo-inositol (Ins), 12.5 mM glutamine (Glu), 5 mM lactate, 50 mM KH_2PO_4 , 12.5 mM NaOH, 0.1% NaN_3 , 1ml/L magnevist.

The spectra were acquired using similar acquisition parameters as for *in vivo* studies. The only difference refers to the number of signal averages: 64 for water suppressed spectra, and 8 for water unsuppressed ones. The spectra were acquired from the center of the phantom located in the scanner isocenter. The median time interval between the *in vitro* measurements was eight days (time interval range: 2–90 days). The total number of short TE measurements was 118 and the total number of long TE measurements was 116. The room temperature was controlled before 1H MRS *in vitro* studies ($24^\circ \pm 1.5^\circ C$). The signal-to-noise ratios (SNRs) for metabolites were estimated by taking the ratio of the peak amplitude to the standard deviation of a metabolite free region of the spectrum.

The NAA *in vitro* metabolite levels output by LCModel (corrected for voxel size, TG, R1 and R2, and obtained using $f_{calib} = 1$) were subjected to change-point analysis to identify break points when the shifts in the phantom metabolite levels occurred.⁽¹⁴⁾ This method uses cumulative sum control charts and bootstrapping to detect changes in mean values (10000 bootstrap samples were applied in this work). Mean square error estimator was employed to estimate when the change

has occurred. After detection of a change, the data are broken into two parts, one each side of the change-point, and the analysis is repeated for each segment. The procedure continues until no break point is detected. The changes found on a first pass through the data are referred to as level 1 changes, the changes found on a second pass through the data are referred to as level 2 changes, and so forth. The level number indicates the importance of a change. Theoretically, only the data from the previous change and up to the next change should be used in detection of a break point. Changes detected early in the above procedure are most likely to be biased. Therefore, when the set of break points is found, they are reestimated using only surrounding data and changes identified as statistically insignificant are discarded.

On the basis of a change-point analysis, the monitored time period was divided into several time intervals characterized by different coefficients f_T computed as the ratios of the NAA level in the interval encompassing November 16, 2007 (determination of f_{calib}) to the NAA level in the specific time interval.

To rule out possible instability in NAA concentration in the phantom, a similar phantom containing 12.5 mM NAA dissolved in the same solvent as in the original one was prepared. ^1H MRS spectrum (TE 35 ms, TR 1500 ms) was measured from this phantom just after its preparation, and the results were compared to those obtained with the phantom provided by the manufacturer. The NAA stability in the latter phantom was assumed to be evidenced by similarity of the levels of this metabolite in these two phantoms. These comparative measurements were performed on 24 October 2010.

Change-point analysis was applied to the NAA *in vitro* levels because of the highest SNR of this metabolite. However, temporal variation of Cr and Cho was also evaluated and characterized by the coefficients of variations (CV, ratios of standard deviation to the mean). Additionally, variation coefficients of the water-scaled NAA, Cr, and Cho levels are also presented.

III. RESULTS

Figure 1 presents the NAA levels obtained using water scaling and absolute standard calibration (assuming $f_T = 1$) in the studied neurological disorders. It is evident that the water-scaled NAA levels determined from short TE spectra are increased in both cases of Canavan disease (z-scores above 2 SD, Fig. 1(a)). However, the water-scaled NAA levels determined from long TE spectra in this disorder fall within the range corresponding to other neurological disorders (z-scores from 0.41 to 1.20 SD, Fig. 1(b)). Relaxation changes are expected to be responsible for these contradicting results. To eliminate the confounding effect of water relaxation changes the NAA levels determined based on the absolute standard calibration should be considered. Figures 1(c) and 1(d) show that the NAA z-scores for case 1 are above 2 SD both in short (z-scores from 5.8 to 7.6 SD) and long TE spectra (z-scores from 6.0 to 7.9 SD). The difference between the NAA levels determined from two short TE spectra in case 2 and the NAA levels measured in other neurological disorders is slightly below the border value for statistical significance (z-scores around 1.9 SD). The remaining short and long TE spectra reveal NAA z-scores above 2 SD in this case (z-scores from 2.1 to 3.5 SD in short TE spectra and from 2.3 to 3.0 SD in long TE spectra). However, reliable quantification of NAA levels based on the absolute standard method requires careful analysis of scanner performance reproducibility.

Comparison of the *in vitro* reproducibility of metabolite levels corrected for TG, R1, and R2 with the results of water-scaling technique is presented in Fig. 2. The coefficients of variation and the SNR parameters for NAA, Cho, and Cr are given in Table 1. The variation coefficients of metabolite concentrations corrected for TG, R1, and R2 vary from 5.41% to 5.96% for short TE spectra and from 4.84% to 6.19% for long TE spectra. The variation coefficients of metabolite concentrations obtained with the use of a water-scaling technique fall within the range from 1.86% to 2.8% for short TE spectra and from 2.32% to 4.61% for long TE spectra.

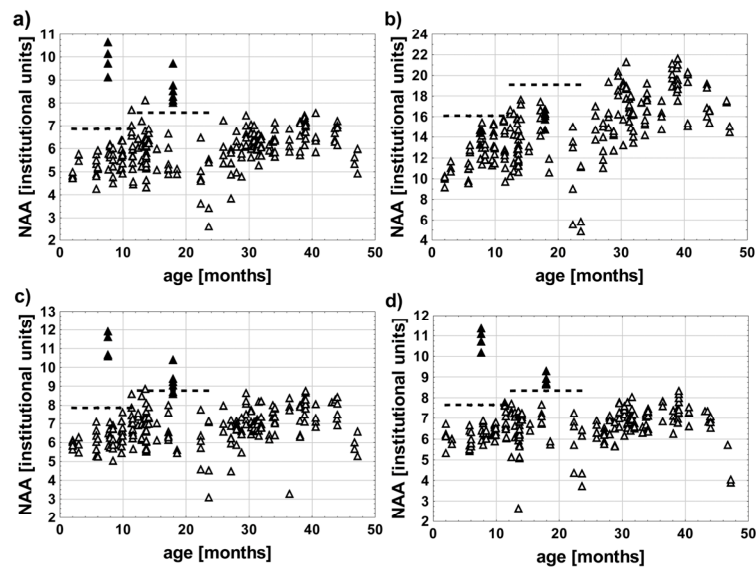


FIG. 1. Water-scaled NAA levels obtained from short TE ^1H MRS *in vivo* spectra (a), water-scaled NAA levels obtained from long TE ^1H MRS *in vivo* spectra (b), NAA levels determined based on absolute standard (before application of f_T coefficient) from short TE ^1H MRS *in vivo* spectra (c), and NAA levels determined based on absolute standard (before application of f_T coefficient) from long TE ^1H MRS *in vivo* spectra (d). Full triangles represent two cases diagnosed with Canavan disease, open triangles represent patients diagnosed with other neurological disorders, dashed lines indicate the threshold of 'mean + 2 SD' computed separately for patients aged 2–12 months and 12–24 months. The NAA concentrations were not corrected for relaxation and are expressed in institutional units.

Figure 3 shows the relationship between CV and SNR for the evaluated metabolites. B1 inhomogeneity, the variations in coil loading conditions, as well as in hardware performance, do not influence metabolite levels determined with the use of water-scaling technique and a lower limit of reproducibility obtained in this method is set by SNR. We therefore expect CV of at least $\frac{100\%}{\text{SNR}}$. Of note, statistically significant relationship ($CV = \frac{106.9}{\text{SNR}} + 1.2$, $p < 0.01$) was found between CV and SNR in water-scaling technique. As expected, variability of metabolite levels corrected for TG, R1, and R2 is caused also by some different sources of error than noise in the spectra.

The measurements performed on October 24, 2010 confirmed the NAA stability in the phantom (the difference between the NAA levels obtained with two comparative measurements was 0.5%). Due to the highest SNR (Table 1), this metabolite was subjected to change-point analysis.

Tables 2 and 3 present values of f_T coefficients obtained from change-point analysis of short and long TE data. Both sets of data indicate that the most important change occurred around October 30, 2007 (f_T changed from 1.08 to 1.0). This change was detected on the first pass through the data and is described by a relatively narrow confidence interval. The change around July 23, 2008 detected in short TE data and the change around May 28, 2008 detected in long TE data are characterized by wide overlapping confidence intervals and cannot be accurately pinpointed. However, the magnitudes of these changes are lower than of that for October 30, 2007. The confidence intervals for three subsequent change-points determined from short and long TE data also overlap, suggesting agreement between these two datasets. However, in the long TE data, a change around October 19, 2006 was detected which was not found in the short TE data. This change is, however, characterized by a wide confidence interval.

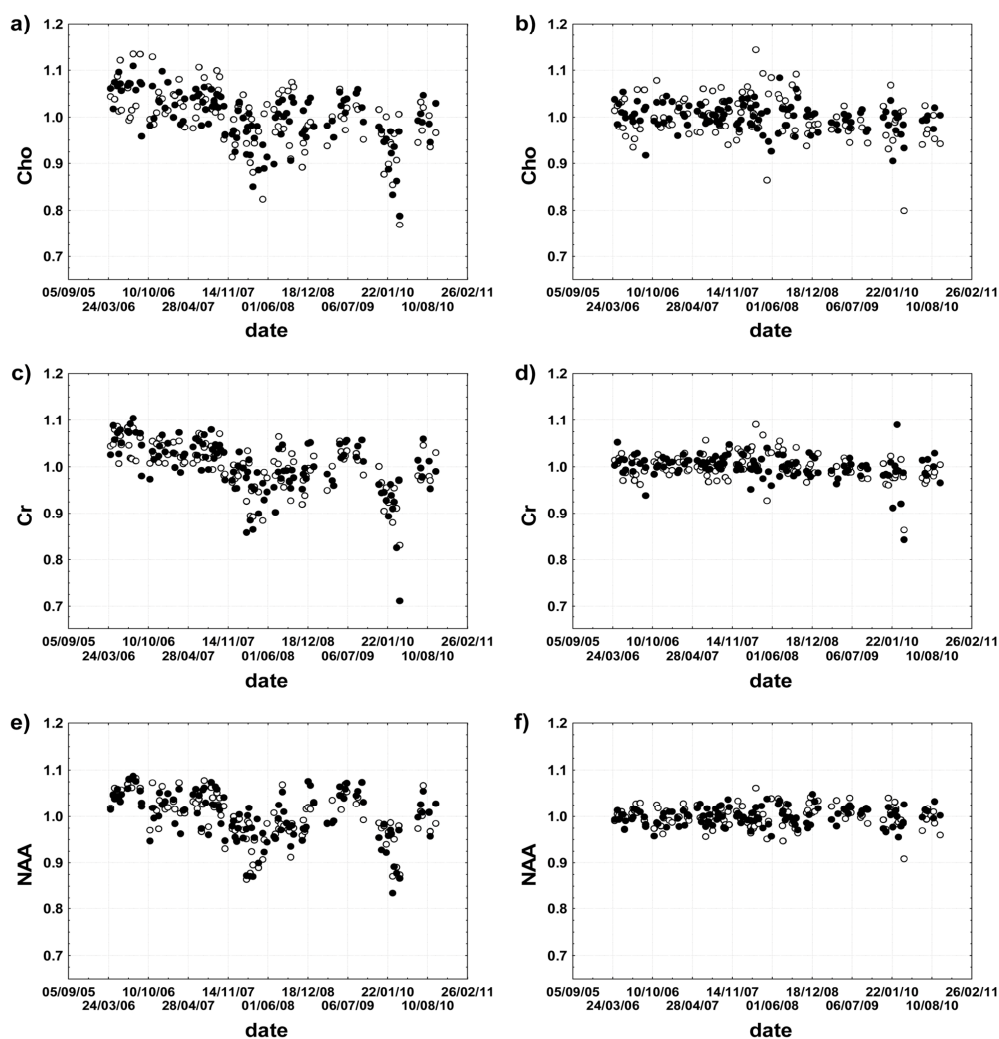


FIG. 2. Temporal variability of metabolite levels obtained from ^1H MRS *in vitro* measurements: Cho (a), Cr (c), and NAA (e) *in vitro* levels corrected for TG, R1, and R2; and Cho (b), Cr (d), and NAA (f) *in vitro* levels obtained using a water-scaling technique. Dots represent short TE data, while circles represent long TE data. The metabolite levels are expressed relative to their mean levels in the period from April 2006 to September 2010.

TABLE 1. CVs and SNRs for the Cho, NAA, and Cr levels obtained from *in vitro* studies.

Metabolite	TE (ms)	SNR (mean \pm standard deviation)	CV	CV
			of Metabolite Levels Corrected for TG, R1, R2 (%)	of Water Scaled Metabolite Levels (%)
Cho	35	54 \pm 7	5.83	2.8
	144	33 \pm 6	6.19	4.61
NAA	35	144 \pm 20	5.41	1.86
	144	110 \pm 14	5.03	2.32
Cr	35	85 \pm 11	5.96	2.73
	144	62 \pm 11	4.84	2.73

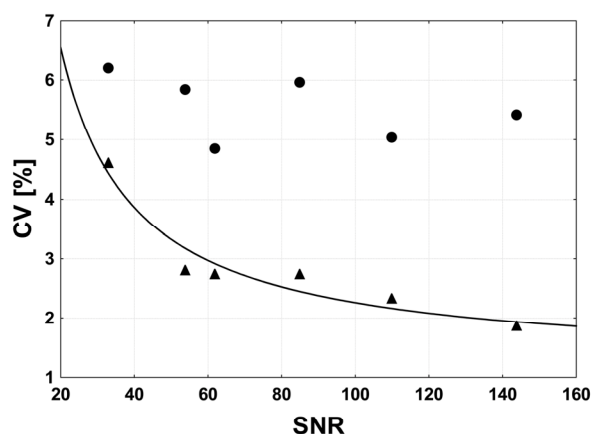


FIG. 3. Relationship between CV and SNR for NAA, Cho, and Cr *in vitro* levels. Dots represent data corrected for TG, R1, and R2 and triangles represent data obtained using water-scaling technique. Both short and long TE *in vitro* data are included (Table 1). Statistically significant relationship ($CV = \frac{106.9}{SNR} + 1.2$, $p < 0.01$) was found between CV and SNR in water-scaling technique.

TABLE 2. The coefficients f_t obtained from a change-point analysis of *in vitro* NAA levels corrected for TG, R1, and R2 (short TE data) in the period from April 2006 to September 2010.

Change-point	Confidence Interval	Confidence Level (%)	Change From	Change To	Level
30 Oct 2007	10 Oct 2007–12 Dec 2007 (2.1 months)	100	1.08	1.0	1
23 Jul 2008	5 Dec 2007 – 26 Nov 2008 (11.9 months)	94	1.0	1.03	6
19 Dec 2008	20 Nov 2008 – 20 Apr 2009 (5 months)	100	1.03	1.09	7
10 Dec 2009	23 Sep 2009 – 22 Dec 2009 (3 months)	100	1.09	0.97	8
22 Jun 2010	17 Feb 2010 – 6 Jul 2010 (4.6 months)	95	0.97	1.06	6

TABLE 3. The coefficients f_T obtained from a change-point analysis of *in vitro* NAA levels corrected for TG, R1, and R2 (long TE data) in the period from April 2006 to September 2010.

Change-point	Confidence Interval	Confidence Level (%)	Change From	Change To	Level
19 Oct 2006	27 Jul 2006 – 4 Apr 2007 (8.4 months)	98	1.11	1.08	6
30 Oct 2007	24 Oct 2007 – 19 Dec 2007 (1.9 months)	100	1.08	1.0	1
28 May 2008	12 Dec 2007 – 26 Nov 2008 (11.7 months)	96	1.0	1.03	5
10 Dec 2008	24 Sep 2008 – 17 Jan 2009 (3.8 months)	99	1.03	1.08	5
10 Dec 2009	23 Sep 2009 – 4 Jan 2010 (3.4 months)	100	1.08	1.0	5
6 Jul 2010	4 Jan 2010 – 18 Aug 2010 (7.5 months)	92	1.0	1.06	4

Summarizing, the monitored time period was divided into six time intervals based on short TE data (seven time intervals based on long TE data) characterized by f_T coefficient ranging from 0.97 to 1.09 (based on short TE data) and from 1.0 to 1.11 (based on long TE data).

Tables 4 and 5 present the number of patients studied in the particular time periods determined from the change-point analysis. As seen from these tables, the majority of the older group of patients (aged 12–24 months) diagnosed with other neurological disorders were examined in the time periods characterized by higher scanner sensitivity than during the period covering case 2 examination. After application of f_T correction factors determined from change-point analysis of short TE *in vitro* data, all the NAA z-scores for case 2 exceed the threshold of 2 SD (z-scores from 2.27 to 4 SD for short TE data and from 2.9 to 3.6 SD for long TE data). The corrected z-scores for case 1 fall within the range from 6.0 to 7.9 SD for short TE and from 6.0 to 8.0 SD for long TE data. Similar results are obtained when the correction factors determined from long TE *in vitro* data are applied.

TABLE 4. Distribution of examinations of patients diagnosed with Canavan disease and other neurological disorders among time periods determined from change-point analysis of short TE *in vitro* data.

Time Period	f_T	Examinations of Patients Diagnosed with:			
		Canavan Disease		Other Neurological Disorders	
		Case 1	Case 2	Aged 2-12 months	Aged 12-24 months
3 Apr 06 - 30 Oct 07	1.08	+		6	6
31 Oct 07 – 23 Jul 08	1.0		+	5	2
24 Jul 08 – 19 Dec 08	1.03			1	-
20 Dec 08 – 10 Dec 09	1.09			2	1

TABLE 5. Distribution of examinations of patients diagnosed with Canavan disease and other neurological disorders among time periods determined from change-point analysis of long TE *in vitro* data.

Time Period	f_T	Examinations of Patients Diagnosed with:			
		Canavan Disease		Other Neurological Disorders	
		Case 1	Case 2	Aged 2-12 months	Aged 12-24 months
3 Apr 06 -19 Oct 06	1.11			1	-
20 Oct 06 – 30 Oct 07	1.08	+		5	6
31 Oct 07 – 28 May 08	1.0		+	3	2
29 May 08 – 10 Dec 08	1.03			3	-
11 Dec 08 – 10 Dec 09	1.08			2	1

IV. DISCUSSION

Canavan disease is a rare form of leukodystrophy caused by a deficiency of aspartoacylase — an enzyme hydrolyzing NAA to acetate and aspartate. This metabolic defect leads to accumulation of NAA in plasma, urine, and brain. As NAA is the most prominent signal in ^1H MRS *in vivo* spectra of the normal brain, this method is believed to provide useful diagnostic information in this condition. The high NAA-to-Cr or NAA-to-Cho ratios are widely documented metabolic spectroscopic findings in this disease.^(22,23) However, the results of absolute NAA quantification should be interpreted with caution. The concentration of NAA measured using ^1H MRS with respect to the wet weight of brain tissue or to the brain volume is expected to be underestimated due to reduced cellularity and increased water content observed in this disease. Both normal⁽²³⁾ and increased⁽²²⁾ NAA concentrations were reported in Canavan disease using fully relaxed water signal as an internal standard. In our work, interpretation of water-scaled metabolite levels is even more difficult due to lack of relaxation corrections. Of note, these corrections are rarely

performed in a routine clinical practice. Since long TE spectra are more vulnerable to changes in T2 relaxation times than short TE ones, we observed that the NAA level obtained from long TE spectra in Canavan disease falls within the range corresponding to other neurological disorders. The NAA level obtained by means of absolute reference technique was found to be increased both in short and long TE spectra. However, reliability of metabolite concentrations obtained using this technique depends on the location-dependent coil B1 variability, adequate loading correction, and adjustment for temporal changes in the scanner performance.

According to LCMoel manual, automatically determined TG can be used for computation of absolute metabolite concentrations at GE 1.5 T scanner.⁽¹⁸⁾ This parameter is widely used for coil load correction,^(24,25) but it does not account for local B1 inhomogeneities. The location dependent B1 variability is especially problematic in the analysis of interregional metabolic differences. In this study, the spectra acquired from several white matter localizations were pooled in the analysis to assess global — rather than location-specific — metabolic changes in CD, so incorporation of B1 inhomogeneity correction was not a critical step in our work. Similarly, Hájek et al.,⁽¹²⁾ Schirmer and Auer,⁽¹⁰⁾ and Brooks et al.⁽⁵⁾ did not consider B1 inhomogeneity corrections in their studies devoted to evaluation of reproducibility of absolute reference technique at 1.5 T. However, fitting of the localized signal to the flip angle variation around 90° to account both for loading effects and B1 inhomogeneities would increase the precision of absolute reference technique and should be considered as a valuable modification of the methods presented in our work.^(26,27)

The most critical point in our work was to use the *in vitro* measurements to ensure that the *in vivo* NAA increase observed in two cases of Canavan disease represents true pathology and is not hardware related. Similarly, Soreni et al.⁽¹³⁾ used phantom measurements to rule out the risk that systematic variation due to scanner performance accounts for the changes observed in repeated measurements of striatal NAA levels. Long-term monitoring of scanner stability over a one-year period made it possible to increase the precision of *in vivo* metabolite levels normalized based upon the principle of reciprocity by about 4% in the study of Hajek et al.⁽¹²⁾ Breakdown of MR system and replacement of the coil and preamplifier were reported to be associated with the most significant changes in f_T in the Hajek study (up to around 50%). In our work, long-term variation was considerably lower. Despite longer time of scanner evaluation, neither head coil nor the preamplifier was replaced during this period. We could tentatively correlate the change-point around October 19, 2006 (seen only in long TE data) with the only breakdown of the system in the monitored period, and the change-point around October 10, 2008 with the system upgrade. It is also possible that some change-points (for example around October 30, 2007) were influenced to some degree by service engineers' interventions. However, precise correlation of the changes observed in our *in vitro* spectroscopic measurements with the actual changes in hardware performance would require more elaborated and time-consuming quality control procedures performed in parallel with the presented ones.⁽²⁸⁾ Although service engineers usually check the performance of MRI systems during the routine visits, Sobol et al.⁽²⁹⁾ found that 80% of the independently evaluated systems revealed deficiencies affecting image quality. Moreover, engineers are mainly focused on obtaining agreement with specified parameters, while the user may wish to observe any drifts in the scanner performance affecting absolute quantification. Although there were not many 'natural' break points in our study (no hardware parts replacement and only one breakdown of the system), change-point analysis was successful in detection of subtle changes. Time-dependent shifts in the *in vitro* NAA levels are sensitive, although not specific, indicators of changes affecting directly absolute metabolite quantification such as resonance frequency, flip angles, coil tuning, loading correction, gradient calibration, and receiver gain settings. Since all of these factors are important in metabolite quantification, periodical monitoring of scanner reproducibility presented in our work should facilitate this task and is well-suited for a busy clinical scanner. Although traditional control charts are preferred for online assessment of metabolite levels change-point analysis is better

suited for analysis of historical data.⁽¹⁴⁾ Thus, application of this technique for retrospective analysis of large datasets collected during several years is fully justified.

Although phantom measurements cannot reproduce conditions encountered in *in vivo* studies, they constitute a valuable source of information about the best possible reproducibility. Schirmer and Auer⁽¹⁰⁾ measured short TE spectra from a brain phantom twice a week over a period of 13 months. Their coefficients of variation for the NAA, Cho, and Cr concentrations obtained based on the principle of reciprocity were 3.3%, 3.8%, and 4%, respectively. Simmons et al.⁽¹¹⁾ evaluated variability in metabolite concentrations obtained from long TE spectra scaled to water over a period of two years and found that the coefficients of variation for NAA, Cho, and Cr were 1.5%, 2.4%, and 1.5%, respectively. Comparing these findings with ours, it should be emphasized that the results of reproducibility measurements are highly scanner-specific and depend also on the acquisition parameters influencing SNR (for example, both Schirmer and Simmons studies used higher number of spectra averages; furthermore, the Simmons study applied longer TR).

V. CONCLUSIONS

This work presents the usefulness of long-term *in vitro* MR system reproducibility monitoring in interpretation of *in vivo* results in rare white matter disorders. This is the first report of combining unsupervised change-point detection technique with spectroscopic phantom measurements in quality control of an MRS system. Taking technical complexity of MRS systems into account, application of powerful unsupervised techniques facilitates absolute quantification of metabolites.

REFERENCES

1. Skorupa A, Jamroz E, Paprocka J, Sokół M, Wicher M, Kiełtyka A. Bridging the gap between metabolic profile determination and visualization in neurometabolic disorders: a multivariate analysis of proton magnetic resonance *in vivo* spectra. *J Chemometrics*. 2013;27(3-4):76–90.
2. Keevil SF, Barbiroli B, Brooks JC, et al. Absolute metabolite quantification by *in vivo* NMR spectroscopy: II. A multicentre trial of protocols for *in vivo* localised proton studies of human brain. *Magn Reson Imaging*. 1998;16(9):1093–106.
3. Christiansen P, Henriksen O, Stubgaard M, Gideon P, Larsson HB. *In vivo* quantification of brain metabolites by 1H-MRS using water as an internal standard. *Magn Reson Imaging*. 1993;11(1):107–18.
4. Majós C, Julià-Sapé M, Alonso J, et al. Brain tumor classification by proton MR spectroscopy: comparison of diagnostic accuracy at short and long TE. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2004;25(10):1696–704.
5. Brooks WM, Wesley MH, Koditwakkhu PW, Garry PJ, Rosenberg GA. 1H-MRS differentiates white matter hyperintensities in subcortical arteriosclerotic encephalopathy from those in normal elderly. *Stroke*. 1997;28(10):1940–43.
6. Brief EE, Moll R, Li DK, Mackay AL. Absolute metabolite concentrations calibrated using the total water signal in brain (1)H MRS. *NMR Biomed*. 2009;22(3):349–54.
7. Sirrs SM, Laule C, Mädler B, et al. Normal-appearing white matter in patients with phenylketonuria: water content, myelin water fraction, and metabolite concentrations. *Radiology*. 2007;242(1):236–43.
8. Helms G. The principles of quantification applied to *in vivo* proton MR spectroscopy. *Eur J Radiol*. 2008;67(2):218–29.
9. Marshall I, Wardlaw J, Cannon J, Slattery J, Sellar RJ. Reproducibility of metabolite peak areas in 1H MRS of brain. *Magn Reson Imaging*. 1996;14(3):281–92.
10. Schirmer T and Auer DP. On the reliability of quantitative clinical magnetic resonance spectroscopy of the human brain. *NMR Biomed*. 2000;13(1):28–36.
11. Simmons A, Smail M, Moore E, Williams SC. Serial precision of metabolite peak area ratios and water referenced metabolite peak areas in proton MR spectroscopy of the human brain. *Magn Reson Imaging*. 1998;16(3):319–30.
12. Hájek M, Burian M, Dezortová M. Application of LCMoDel for quality control and quantitative *in vivo* 1H MR spectroscopy by short echo time STEAM sequence. *MAGMA*. 2000;10(1):6–17.
13. Soreni N, Noseworthy MD, Cormier T, Oakden WK, Bells S, Schachar R. Intraindividual variability of striatal (1)H-MRS brain metabolite measurements at 3 T. *Magn Reson Imaging*. 2006;24(2):187–94.

14. Taylor W. Change-Point Analysis: A powerful new tool for detecting changes. 2000 [cited 2013 Oct 13]. Available from: <http://www.variation.com/cpa/tech/changepoint.html>
15. Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med*. 1993;30(6):672–79.
16. Hoult DI and Richards RE. The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment. *J Magn Reson*. 1976;24(1):71–85.
17. Michaelis T, Merboldt KD, Bruhn H, Hänicke W, Frahm J. Absolute concentrations of metabolites in the adult human brain in vivo: quantification of localized proton MR spectra. *Radiology*. 1993;187(1):219–27.
18. Provencher SW. LCMModel and LCMgui User's Manual. 2014 Available from: <http://www.s-provencher.com/pub/LCMModel/manual/manual.pdf>
19. Hashimoto T, Tayama M, Miyazaki M, et al. Developmental brain changes investigated with proton magnetic resonance spectroscopy. *Dev Med Child Neurol*. 1995;37(5):398–405.
20. Blüm S, Wisnowski JL, Nelson MD Jr, et al. Metabolic maturation of the human brain from birth through adolescence: insights from in vivo magnetic resonance spectroscopy. *Cereb Cortex*. 2013;23(12):2944–55.
21. Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri AM. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol*. 2007;81(2):89–131.
22. Wittsack HJ, Kugel H, Roth B, Heindel W. Quantitative measurements with localized 1H MR spectroscopy in children with Canavan's disease. *J Magn Reson Imaging*. 1996;6(6):889–93.
23. Barker PB, Bryan RN, Kumar AJ, Naidu S. Proton NMR spectroscopy of Canavan's disease. *Neuropediatrics*. 1992;23(5):263–67.
24. Horská A, Kaufmann WE, Brant LJ, Naidu S, Harris JC, Barker PB. In vivo quantitative proton MRSI study of brain development from childhood to adolescence. *J Magn Reson Imaging*. 2002;15(2):137–43.
25. Kumar A, Thomas A, Lavretsky H, et al. Frontal white matter biochemical abnormalities in late-life major depression detected with proton magnetic resonance spectroscopy. *Am J Psychiatry*. 2002;159(4):630–36.
26. Helms G. A precise and user-independent quantification technique for regional comparison of single volume proton MR spectroscopy of the human brain. *NMR Biomed*. 2000;13(7):398–406.
27. Gustafsson MC, Dahlqvist O, Jaworski J, Lundberg P, Landtblom AM. Low choline concentrations in normal-appearing white matter of patients with multiple sclerosis and normal MR imaging brain scans. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007;28(7):1306–12.
28. Woo DC, Choi CB, Kim SS, et al. Development of a QA phantom and protocol for proton magnetic resonance spectroscopy. *Concepts Magn Reson Part B*. 2009;35B(3):168–79.
29. Sobol WT, NessAiver MS, Orton CG. Point/counterpoint. The physics components of the ACR MRI Accreditation Program are overly tedious and beyond what is needed to ensure good patient care. *Med Phys*. 2008;35(8):3419–21.

11 Załącznik: Zastosowanie metody ^1H MRS *in vivo* oraz wielowymiarowych technik analizy danych w ocenie niejednorodności metabolicznej mózgowia

11.1 Wstęp

Badania metabolizmu odrywają coraz większą rolę w rozpoznawaniu chorób neurologicznych oraz w monitorowaniu efektów terapeutycznych [56]. Wyznaczenie profili metabolicznych różnych lokalizacji anatomicznych w zdrowym mózgowiu jest konieczne dla pełnego zrozumienia zaburzeń biochemicznych występujących w stanach chorobowych. Liczne prace potwierdziły niejednorodność poziomów metabolitów wyznaczanych przy pomocy techniki ^1H MRS *in vivo* w ośrodkowym układzie nerwowym [57-60]. Zastosowane w tych pracach jednowymiarowe metody analizy (np. ANOVA) nie są jednak efektywne w wizualizacji zależności między różnymi obszarami anatomicznymi oraz między metabolitami.

Chociaż metody rozpoznawania wzorców są coraz częściej wykorzystywane w analizie widm ^1H MRS *in vivo* charakteryzujących procesy patologiczne [61,62], w piśmiennictwie nie zostało do tej pory opisane zastosowanie tych technik w rozróżnieniu widm zarejestrowanych z różnych lokalizacji anatomicznych mózgu u zdrowych ochotników. Uzupełniającym celem niniejszej pracy doktorskiej było sprawdzenie skuteczności wielowymiarowych metod redukcji wymiaru danych w ocenie niejednorodności metabolicznej mózgowia.

11.2 Materiały i metody

11.2.1 Grupa badana

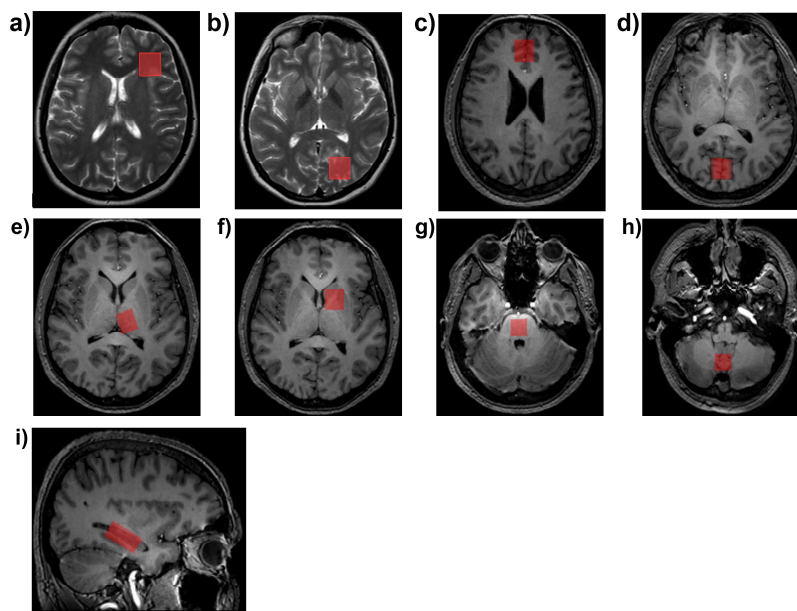
Grupę badaną stanowiło 71 zdrowych ochotników (28 mężczyzn i 43 kobiety, zakres wieku: 18-36 lat, mediana wieku: 26 lat). Ochotnicy ci brali udział w dwóch oddzielnych projektach badawczych prowadzonych w Centrum Onkologii - Instytucie im. Marii Skłodowskiej – Curie w Gliwicach:

- projekt I – charakterystyka metaboliczna istoty białej (czołowej i potylicznej)
- projekt II – charakterystyka metaboliczna czołowej istoty szarej, potylicznej istoty szarej, hipokampa, wzgórza, jąder podstawnych, robaka mózdzku i mostu.

11.2.2 Badania ^1H MRS *in vivo*

Widma ^1H MRS *in vivo* zarejestrowano przy użyciu skanera Philips Achieva 3T wyposażonego w cewkę nadawczą BODY oraz 8-kanalową cewkę odbiorczą SENSE. W projekcie I obszary zainteresowania lokalizowane były na podstawie obrazów T2-zależnych rejestrowanych w płaszczyźnie porzeczej, strzałkowej i czołowej (Turbo Spin Echo, TR = 2830 ms, TE = 80 ms, kąt odchylenia namagnesowania 90° , grubość warstwy 5 mm, rozdzielczość w płaszczyźnie obrazowania 0.45×0.45 mm). W projekcie II lokalizacja prowadzona była na podstawie obrazów T1-zależnych (3D Turbo Field Echo, TR = 9 ms, TE = 4,6 ms, kąt odchylenia namagnesowania 10° , rozdzielczość = $1 \times 1 \times 1$ mm). Rysunek 4 przedstawia obszary zainteresowania wymienione w punkcie 11.2.1 wraz z informacją o wymiarach tych obszarów. Widma z okolic czołowej i potylicznej istoty białej mierzono obustronnie.

Widma ^1H MRS *in vivo* rejestrowano przy następujących parametrach: TE = 31 ms, TR = 2000 ms, liczba uśrednień sygnału 64 (dla wokseli o objętości 8 ml) lub 128 (dla wokseli o objętości 4,6 – 7 ml), sekwencja lokalizacyjna PRESS. Liczba widm zarejestrowanych u każdego ochotnika wynosiła od 1 do 7, a całkowita liczba widm wynosiła 327.



Rysunek 4. Lokalizacja objętości spektroskopowych: (a) czołowa istota biała [FWM (*Frontal White Matter*), $2 \times 2 \times 2$ cm], (b) potyliczna istota biała [OWM (*Occipital White Matter*), $2 \times 2 \times 2$ cm], (c) czołowa istota szara [FGM (*Frontal Grey Matter*), $2 \times 2 \times 2$ cm], (d) potyliczna istota szara [OGM (*Occipital Grey Matter*), $2 \times 2 \times 2$ cm], (e) wzgórze [T (*Thalamus*), $2 \times 1.75 \times 1.75$ cm], (f) jądra podstawne [BG (*Basal Ganglia*), $2 \times 2 \times 1.75$ cm], (g) most [P (*Pons*), $1.5 \times 1.75 \times 1.75$ cm], (h) robak mózdzku [CV (*Cerebellar Vermis*), $1.5 \times 1.75 \times 1.75$ cm], (i) hipokamp [H (*Hippocampus*), $3 \times 1.5 \times 1.5$ cm].

11.2.3 Analiza danych ^1H MRS *in vivo*

W celu wyznaczenia objętościowych frakcji istoty szarej (f_{GM}), istoty białej (f_{WM}) oraz płynu mózgowo-rdzeniowego (f_{CSF}) w wokselałach spektroskopowych przeprowadzono segmentację obrazów anatomicznych przy pomocy oprogramowania SPM8 [63] i BIU [64].

Aby sprawdzić zasadność łączenia danych zarejestrowanych w projektach I i II, dla podgrupy 17 ochotników biorących udział w badaniu II zarejestrowano zarówno obrazy T1-zależne o wysokiej rozdzielczości, jak i obrazy T2-zależne w trzech płaszczyznach. Uzyskano zadowalającą zgodność między objętościową frakcją istoty białej wyznaczoną na podstawie obrazów T1-zależnych ($f_{WM,T1}$) oraz T2-zależnych ($f_{WM,T2}$): $f_{WM,T2} = 1.09 \cdot f_{WM,T1}$ (współczynnik korelacji $r = 0.93$).

Poziomy metabolitów zostały wyznaczone z wykorzystaniem oprogramowania LCModel metodą skalowania do nietłumionego sygnału wody [12]. Dla widm ^1H MRS *in vivo* zarejestrowanych z lokalizacji czołowych, potylicznych oraz z hipokampa zastosowano wzór:

$$C_{met} = S_m \cdot \left(\frac{f_{GM} \cdot R_{GM} \cdot WD_{GM} + f_{WM} \cdot R_{WM} \cdot WD_{WM} + f_{CSF} \cdot R_{CSF} \cdot WD_{CSF}}{(1 - f_{CSF}) \cdot S_{H2O}} \right) \cdot \frac{2}{N_{met}} \cdot C_{H2O} \quad (1)$$

gdzie: S_m , S_{H2O} , N_{met} , C_{H2O} , WD_i oznaczają: intensywność integralną sygnału metabolitu, intensywność integralną sygnału wody nietłumionej, liczbę protonów w cząsteczce metabolitu, stężenie wody 55.5 M oraz zawartość wody w kompartmentie i [i = istota biała (WM), istota szara (GM) lub płyn mózgowo-rdzeniowy (CSF)]. Człony R_i są współczynnikami korekcyjnymi ze względu na niepełną relaksację sygnału wody w kompartmentie i:

$$R_i = \exp\left(-\frac{TE}{T_{2,i}}\right) \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_{1,i}}\right)\right] \quad (2)$$

gdzie $T_{1,i}$ oraz $T_{2,i}$ oznaczają czasy relaksacji podłużnej i poprzecznej wody w kompartmentie i. W związku z tym, że nie przeprowadzono korekcji ze względu na niepełną relaksację metabolitów, obliczone poziomy związków są wyrażone w jednostkach arbitralnych (i.u.).

Poziomy metabolitów we wzgórzu, moście, robaku mózdzku i jądrach podstawnych zostały wyznaczone z uwzględnieniem podziału objętości obszaru spektroskopowego na: tkankę mózgową (bez podziału na istotę szarą i białą) i płyn mózgowo-rdzeniowy.

W tabeli 3 przedstawiono literaturowe wartości czasów relaksacji oraz stężenia wody w rozpatrywanych lokalizacjach mózgowych.

Lokalizacja anatomiczna	T2 [ms]	T1 [ms]	WD [%]
FWM	74 ^(a)	935 ^(e)	68.4 ^(h)
OWM	80 ^(a)	1021 ^(e)	72.7 ^(h)
FGM	104 ^(a)	1609 ^(e)	77.5 ^(h)
OGM	98 ^(a)	1642 ^(e)	78.3 ^(h)
H	100 ^(b)	1695 ^(e)	82.0 ^(h)
TWM	79 ^(b)	1000 ^(e)	72.5 ^(h)
P	67 ^(c)	1150 ^(e)	73.2 ^(h)
CV	80 ^(c)	1626 ^{(e)*}	77.9 ^(h)
T	76 ^(b)	1150 ^(f)	82.5 ^(h)
BG	71 ^(b)	1405 ^{(f)**}	80.6 ^(h)
CSF	500 ^(d)	4160 ^(g)	97.0 ^(h)

Tabela 3. Wartości czasów relaksacji (T1, T2) oraz stężenia wody (WD) dla różnych lokalizacji anatomicznych. ^(a) Wansapura i wsp. (65), ^(b) Wang i wsp. (66), ^(c) Deelchand i wsp. (67), ^(d) Piechnik i wsp. (68), ^(e) Abbas i wsp. 2014 (69), ^(f) Ethofer i wsp. (70), ^(g) Lin i wsp. (71), ^(h) Abbas i wsp. 2015 (72).

Oznaczenia lokalizacji anatomicznych: FWM – czołowa istota biała, OWM – potyliczna istota biała, FGM – czołowa istota szara, OGM – potyliczna istota szara, T – wzgórze, BG – jądra podstawne, P – most, CV – robak mózdzku, H – hipokamp.

Czasy relaksacji i zawartość wody w skroniowej istocie białej [TWM (*temporal white matter*)] zostały wykorzystane do wyznaczenia poziomów metabolitów w hipokampie.

* Założono, że wartość czasu T1 dla robaka mózdzku odpowiada średniej wartości T1 z obszarów czołowej, potylicznej i ciemieniowej istoty szarej.

** Założono, że wartość czasu T1 dla obszaru jąder podstawnych odpowiada średniej wartości T1 głowy jądra ogoniastego, gałki bladej oraz skorupy.

Dla lokalizacji czołowej i potylicznej wyznaczono zależności między poziomami metabolitów a znormalizowaną frakcją istoty szarej $f_{GM,rel} = \frac{f_{GM}}{f_{GM} + f_{WM}}$ w objętościach pomiarowych metodą regresji liniowej. Chociaż pomiar poziomów metabolitów w obszarach zawierających 100% istoty białej lub 100% istoty szarej jest utrudniony z powodu niskiej rozdzielczości przestrzennej metody ¹H MRS *in vivo*, wartości te zostały oszacowane na podstawie ekstrapolacji wyznaczonych zależności.

Analizie wielowymiarowej (PCA, PLS-DA) zostały poddane zarówno poziomy metabolitów wyznaczone z użyciem oprogramowania LCModel, jak i nierozdzielne widma. Obróbka danych przed zastosowaniem technik wielowymiarowych w analizie nierozdzielnych widm obejmowała: korekcję prądów wirowych, dopełnienie sygnału swobodnej precesji zerami (*ang zero-filling*), usunięcie resztkowego sygnału wody

metodą HSVD (ang. *Hankel Singular Value Decomposition*), eksponencjalną apodyzującą 2 Hz, ręczną korekcję fazy zerowego i pierwszego rzędu. Obróbka ta została przeprowadzona przy użyciu programów jMRUI [74] i Specalign [75]. Nierozdzielone widma zostały wyskalowane do nietłumionego piksu wody w sposób analogiczny do skalowania poziomów metabolitów wyznaczonych przy pomocy programu LCModel.

11.2.4 Analiza wielowymiarowa

Analiza głównych składowych (PCA, *Principal Component Analysis*) jest nienadzorowaną metodą polegającą na transformacji zmiennych wejściowych w nowe nieskorelowane ze sobą zmienne (główne składowe) uszeregowane według kolejności wyjaśnianej wariancji. Model PCA można wyrazić za pomocą wzoru [75]:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (3)$$

gdzie: \mathbf{X} - macierz danych wejściowych, \mathbf{T} - macierz wartości czynnikowych, \mathbf{P} - macierz ładunków czynnikowych, \mathbf{E} - macierz reszt.

Metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów - analiza dyskryminacyjna (*Partial least squares - discriminant analysis*, PLS-DA) jest regresyjnym rozwinięciem PCA. Oprócz macierzy \mathbf{X} zmiennych niezależnych w technice tej jest rozważana macierz \mathbf{Y} zmiennych zależnych (kodująca przynależność obserwacji do określonych grup). Celem tej nadzorowanej metody jest maksymalizacja kowariancji między przestrzeniami \mathbf{X} i \mathbf{Y} . Model PLS-DA można wyrazić za pomocą dwóch relacji zewnętrznych [76]:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (4)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{F} \quad (5)$$

połączonych relacją wewnętrzną:

$$\mathbf{U} = \mathbf{TD} + \mathbf{G} \quad (6)$$

gdzie: \mathbf{T} - macierz wartości czynnikowych przypadków w przestrzeni \mathbf{X} , \mathbf{U} - macierz wartości czynnikowych przypadków w przestrzeni \mathbf{Y} , \mathbf{P} - macierz ładunków czynnikowych w przestrzeni \mathbf{X} , \mathbf{Q} - macierz ładunków czynnikowych w przestrzeni \mathbf{Y} , \mathbf{D} - macierz diagonalna, \mathbf{E} , \mathbf{F} i \mathbf{G} - macierze reszt. Wartości czynnikowe w przestrzeni \mathbf{X} są obliczane jako liniowe kombinacje zmiennych oryginalnych według wzoru:

$$\mathbf{T} = \mathbf{XW}^* \quad (7)$$

gdzie \mathbf{W}^* - macierz wag.

Składowe modeli wielowymiarowych zostały opisane przez frakcje wyjaśnionej zmienności [77]:

$$R^2 = 1 - \frac{RSS}{SS} \quad (8)$$

gdzie: RSS (ang. *Residual Sum of Squares*) – suma kwadratów odchyłeń wartości zaobserwowanych od wartości obliczonych na podstawie modelu, SS (ang. *Sum of Squares*) – suma kwadratów odchyłeń wartości poszczególnych obserwacji od ich wartości średniej.

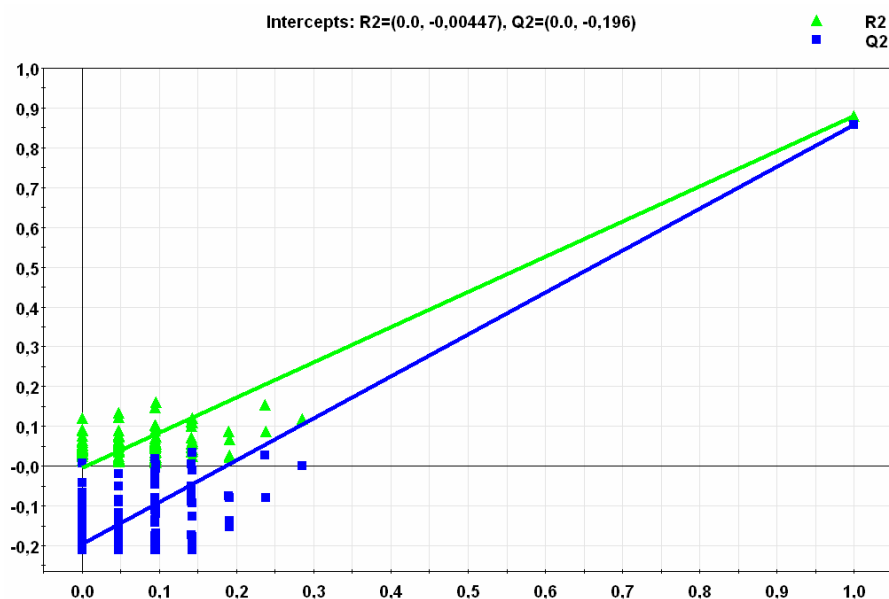
Zdolność predykcyjna modeli PLS-DA (Q^2) została określona metodą 7-krotnej walidacji krzyżowej [78]. Metoda ta polega na wykluczeniu 1/7 obserwacji na etapie konstrukcji modelu oraz na wykorzystaniu tych obserwacji jako zbioru testowego. Proces ten jest powtarzany tak, aby każda obserwacja raz znalazła się w zbiorze testowym. Wartości Q^2 zostały obliczone na podstawie wzoru:

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{SS} \quad (9)$$

gdzie: PRESS (ang. *Prediction Error Sum of Squares*) – suma kwadratów odchyłeń wartości przewidzianych przez model w oparciu o proces walidacji krzyżowej od wartości zaobserwowanych), SS (ang. *Sum of Squares*) – suma kwadratów odchyłeń wartości poszczególnych obserwacji od ich wartości średniej.

Za pomocą parametrów R^2 i Q^2 można scharakteryzować wyjaśnioną zmienność i zdolność predykcyjną odpowiadającą wszystkim zmiennym w przestrzeni X (R^2X) i Y (R^2Y , Q^2Y) dla danej składowej lub skumulowaną zmienność i zdolność predykcyjną (R^2X (cum), R^2Y (cum), Q^2Y (cum)) dla określonej liczby składowych. Poszczególne zmienne oryginalne także mogą zostać scharakteryzowane przez frakcję wyjaśnionej zmienności.

Modele opracowane z wykorzystaniem nadzorowanych technik analizy zostały również poddane testowaniu permutacyjnemu [77]. Metoda ta polega na losowej zmianie przyporządkowania obserwacji do określonych grup w macierzy Y. Porównanie parametrów R^2Y i Q^2Y modelu oryginalnego z odpowiednimi wartościami opisującymi modele uzyskane po losowych zmianach w macierzy Y pozwala wnioskować o istotności statystycznej modelu. Liczba permutacji wynosiła 100. Rysunek 5 przedstawia przykładowe wyniki testu permutacji modelu PLS-DA.



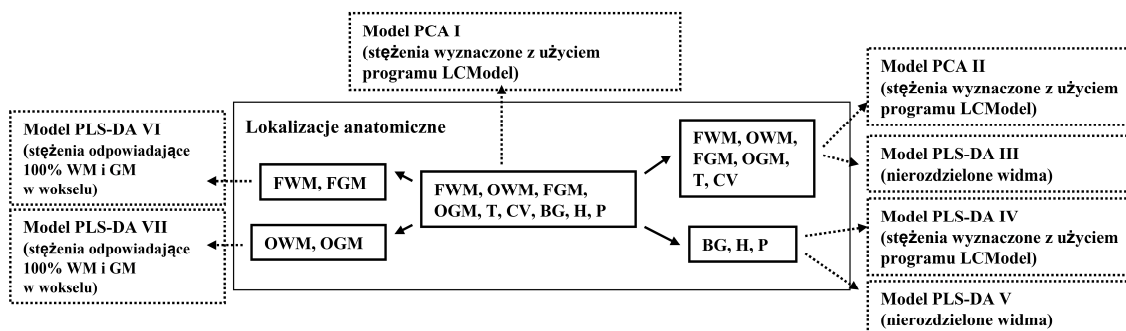
Rysunek 5. Przykładowe wyniki uzyskane z testu permutacji modelu PLS-DA. Na osi odciętych przedstawione są korelacje między rzeczywistymi wartościami y a wartościami permutowanymi. Na osi rzędnych przedstawione są wartości R^2Y i Q^2Y otrzymanych modeli. Metodą regresji liniowej wyznaczone są zależności między wspomnianymi korelacjami a R^2Y i Q^2Y . Przecięcia prostych regresji z osią rzędnych są znacznie niższe niż rzeczywiste wartości R^2Y i Q^2Y modelu oryginalnego (przyporządkowane wartości 1 na osi odciętych), co oznacza dobrą jakość modelu.

Rysunek 6 przedstawia schemat wykonanych analiz wielowymiarowych. Globalna analiza PCA poziomów metabolitów wyznaczonych przy pomocy oprogramowania LCMModel dla wszystkich rozpatrywanych lokalizacji anatomicznych została przeprowadzona w celu wstępnej wizualizacji struktury wariacji w pełnym zbiorze danych (model PCA I). Następnie, oddzielne modele zostały skonstruowane dla:

- obszarów mózgu charakteryzujących się widmami o średniej szerokości połówkowej poniżej 0,055 ppm: czołowej i potylicznej istoty białej, czołowej i potylicznej istoty szarej, wzgórza, robaka mózdzku (modele PCA II i PLS-DA III),
- obszarów mózgu charakteryzujących się widmami o szerokości połówkowej powyżej 0,055 ppm: jąder podstawnych, hipokampa i mostu (modele PLS-DA IV i V).

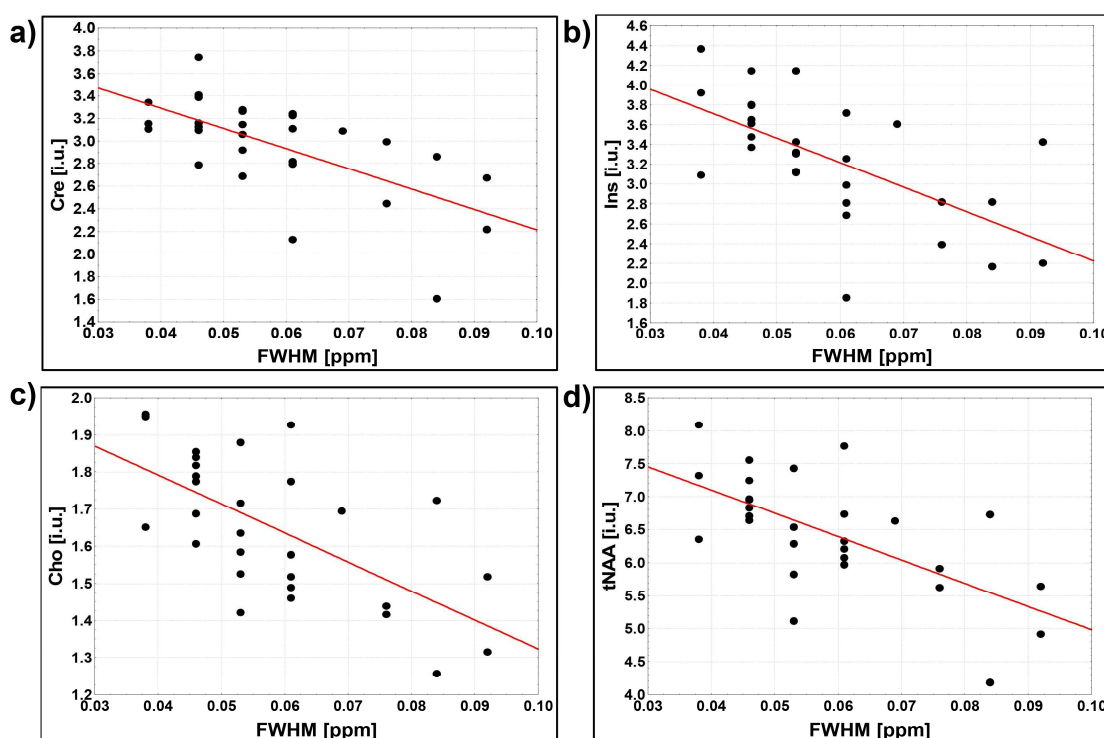
Opracowanie oddzielnych modeli dla widm znacznie różniących się szerokościami połówkowymi wynika z tego, że poziomy metabolitów wyznaczone z użyciem oprogramowania LCMModel są zależne od jakości widm [78]. Analiza widm 1H MRS *in vivo* zarejestrowanych z mostu charakteryzujących się szerokim zakresem szerokości

połówkowych (0,04 – 0,09 ppm) potwierdza spadek poziomów metabolitów wraz ze wzrostem szerokości połówkowych (rysunek 7).



Rysunek 6. Schemat analizy wielowymiarowej.

Oznaczenia lokalizacji anatomicznych: FWM – czołowa istota biała, OWM – potyliczna istota biała, FGM – czołowa istota szara, OGM – potyliczna istota szara, T – wzgórze, BG – jądra podstawne, P – most, CV – robak mózdzku, H – hipokamp.



Rysunek 7. Liniowe zależności między poziomami metabolitów a szerokościami połówkowymi (FWHM, *full width at half maximum*) dla widm zarejestrowanych z mostu: (a) Kreatyna (Cre): $y = -17.9x + 4.0$, $r = 0.64$, $p = 0.000162$; (b) Myo-inozytol (Ins): $y = -24.8x + 4.7$, $r = 0.63$, $p = 0.000265$, (c) Związki cholinowe (Cho): $y = -7.81x + 2.1$, $r = 0.64$, $p = 0.000196$; (d) N-acetylo-asparaginian + N-acetylo-aspartylglutaminian (tNAA): $y = -35.2x + 8.5$, $r = 0.64$, $p = 0.000185$.

Analizy wielowymiarowe zostały także przeprowadzone w celu rozróżnienia lokalizacji czołowej i potylicznej na podstawie poziomów metabolitów odpowiadających 100-procentowemu udziałowi istoty szarej lub białej w objętościach spektroskopowych (modele PLS-DA VI i PLS-DA VII).

W niniejszej pracy zaniedbano informację o zależności widm zmierzonych u tego samego ochotnika. Nierozdzielne widma ^1H MRS *in vivo* (lub poziomy metabolitów wyznaczone z użyciem oprogramowania LCModel) stanowiły kolejne rzędy macierzy \mathbf{X} . Chociaż techniki wielowymiarowe wymagają spełnienia założenia o niezależności obserwacji, Jolliffe i wsp. wskazują, że są one także przydatne w analizie obserwacji zależnych pod warunkiem, że nadrzędnym celem ich zastosowania nie jest wnioskowanie statystyczne, a jedynie wizualizacja zależności między obserwacjami i między zmiennymi w zbiorze danych [75]. Podobne podejście było stosowane w pracach [79-81].

Stężenia wyznaczone przy pomocy oprogramowania LCModel zostały poddane skalowaniu do jednostkowej wariancji (ang. *unit variance scaling*), a nierozdzielne widma zostały poddane skalowaniu Pareto (77). Analizy wielowymiarowe zostały przeprowadzone z użyciem oprogramowania SIMCA (Umetrics, Umeå Sweden).

11.3 Wyniki

11.3.1 Analiza jednowymiarowa

W tabeli 4 przedstawiono średnie poziomy metabolitów wyznaczone przy użyciu oprogramowania LCModel, ich odchylenia standardowe, współczynniki informujące o składzie tkankowym objętości spektroskopowych oraz parametry określające jakość widm (szerokość połówkowa, stosunek sygnału do szumu) dla różnych lokalizacji anatomicznych.

Test zgodności chi–kwadrat (χ) Pearsona nie wykazał istotnych statystycznie różnic w rozkładzie płci dla różnych obszarów mózgu.

Test Studenta potwierdził brak znamienych różnic w poziomach metabolitów między lewą i prawą półkulą dla obszarów zlokalizowanych w czołowej i potylicznej istocie białej. W kolejnych analizach nie rozróżniano widm w zależności od półkuli.

Lokaliza- cja	Liczba widm	Cre [i.u.]	Ins [i.u.]	Cho [i.u.]	tNAA [i.u.]	Glx [i.u.]	f _{GM}	f _{WM}	f _{CSF}	f _{GM,rel} [%]	FWHM [ppm]	SNR
LFWM	23	3.81±0.46	2.8±0.42	1.17±0.16	5.55±0.45	4.59±0.96	0.22±0.05	0.77±0.06	0.02±0.01	0.22±0.06	0.054±0.006	16.3±2.82
RFWM	25	4.00±0.33	3.03±0.48	1.17±0.13	5.61±0.37	4.32±0.98	0.22±0.06	0.77±0.06	0.01±0.01	0.22±0.06	0.051±0.007	18.75±2.42
LOWM	27	4.3±0.31	3.18±0.29	0.98±0.12	6.37±0.28	3.95±0.63	0.24±0.04	0.74±0.05	0.02±0.01	0.24±0.05	0.042±0.004	22.31±2.51
ROWM	28	4.22±0.27	2.91±0.39	0.95±0.12	6.49±0.31	4.31±1.01	0.26±0.06	0.72±0.06	0.02±0.01	0.27±0.06	0.046±0.006	21.19±3.82
FGM	27	5.29±0.34	4.14±0.59	1.29±0.19	6.50±0.59	7.89±1.07	0.73±0.04	0.12±0.05	0.15±0.03	0.86±0.05	0.039±0.007	21.46±2.67
OGM	28	5.15±0.36	3.66±0.43	0.81±0.14	7.14±0.36	6.38±0.95	0.61±0.06	0.27±0.07	0.12±0.03	0.7±0.08	0.04±0.005	24.59±2.42
T	34	4.82±0.35	2.77±0.46	1.41±0.13	7.05±0.54	3.91±0.83	no	no	0.01±0.02	no	0.048±0.007	18.79±2.86
CV	34	6.59±0.51	4.04±0.45	1.63±0.12	5.19±0.31	6.34±1.05	no	no	0.07±0.04	no	0.043±0.008	16.55±1.79
BG	35	4.60±0.52	1.83±0.58	1.06±0.20	4.78±0.43	5.85±1.68	no	no	0.01±0.01	no	0.072±0.01	15.25±3.61
H	35	3.55±0.65	2.89±0.51	1.18±0.19	4.31±0.77	4.54±1.02	0.62±0.07	0.35±0.08	0.04±0.02	0.64±0.08	0.066±0.01	15.85±1.99
P	31	2.98±0.43	3.29±0.61	1.66±0.20	6.45±0.84	3.07±1.11	no	no	0	no	0.058±0.016	12.66±2.5

Tabela 4. Poziomy metabolitów wyznaczone z użyciem oprogramowania LCModel dla różnych lokalizacji anatomicznych (średnie ± odchylenia standardowe), współczynniki określające skład tkankowy objętości spektroskopowych: f_{GM} (frakcja objętościowa istoty szarej), f_{WM} (frakcja objętościowa istoty białej), f_{CSF} (frakcja objętościowa płynu mózgowo-rdzeniowego), f_{GM,rel} (znormalizowana frakcja istoty szarej).

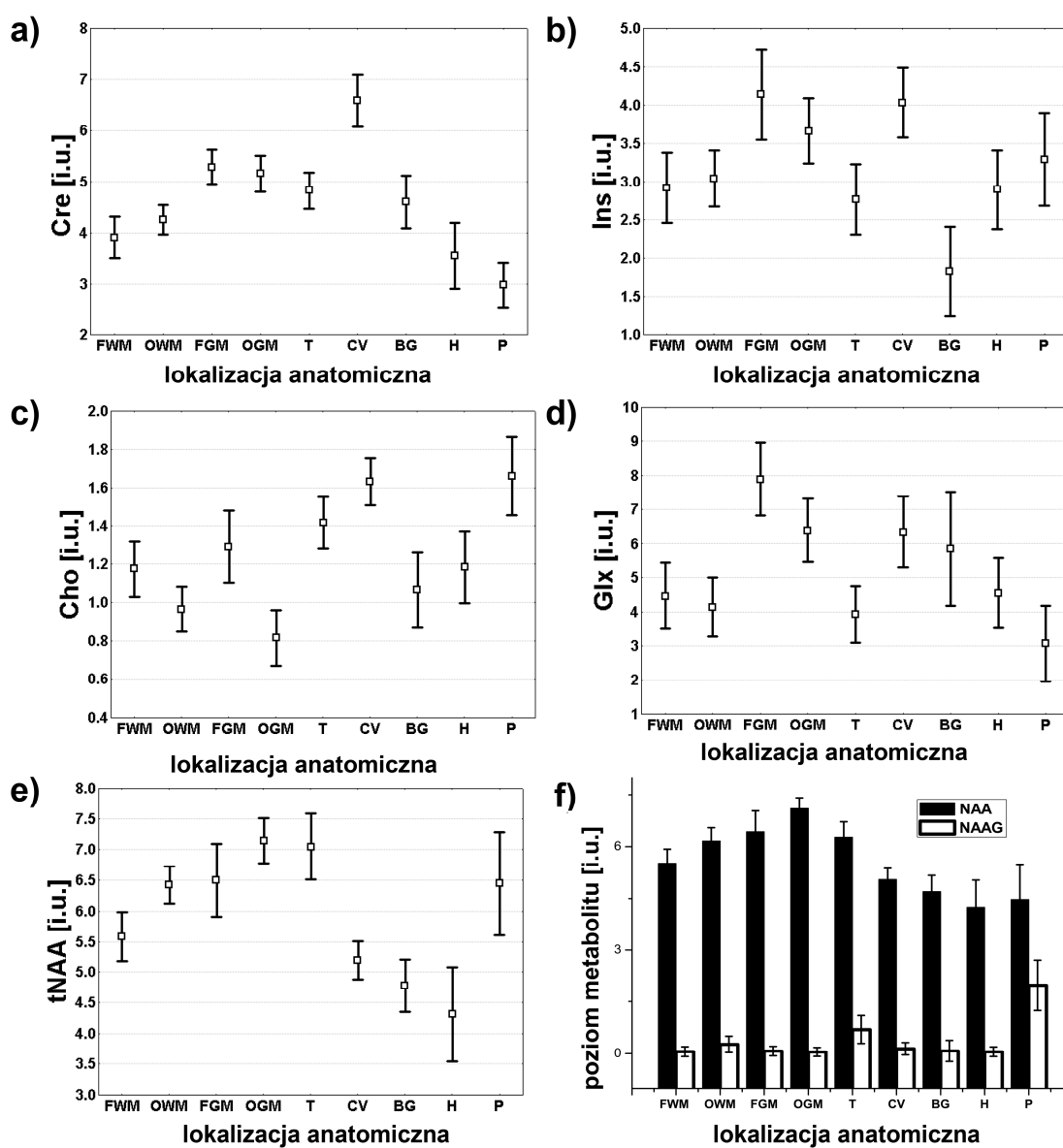
Lokalizacje anatomiczne: LFWM (czołowa istota biała w półkuli lewej, *Left Frontal White Matter*); RFWM (czołowa istota biała w półkuli prawej, *Right Frontal White Matter*); LOWM (potyliczna istota biała w półkuli lewej, *Left Occipital White Matter*); ROWM (potyliczna istota biała w półkuli prawej, *Right Occipital White Matter*), T – wzgórze, BG – jądra podstawne, P – most, CV – robak mózdzku, H – hipokamp.

Metabolity: Kreatyna (Cre), mio-inozytol (Ins), związki cholinowe (Cho), N-acetyloasparaginian + N-acetylo-aspartylo-glutaminian (tNAA), glutamina + glutaminian (Glx)

FWHM (szerokość połówkowa, *full width at half maximum*), SNR (stosunek sygnału do szumu, *signal to noise ratio*).

no, nie określono

Na rysunku 8 przedstawiono średnie i odchylenia standardowe poziomów metabolitów wyznaczonych przy użyciu oprogramowania LCMoDel dla różnych lokalizacji anatomicznych.



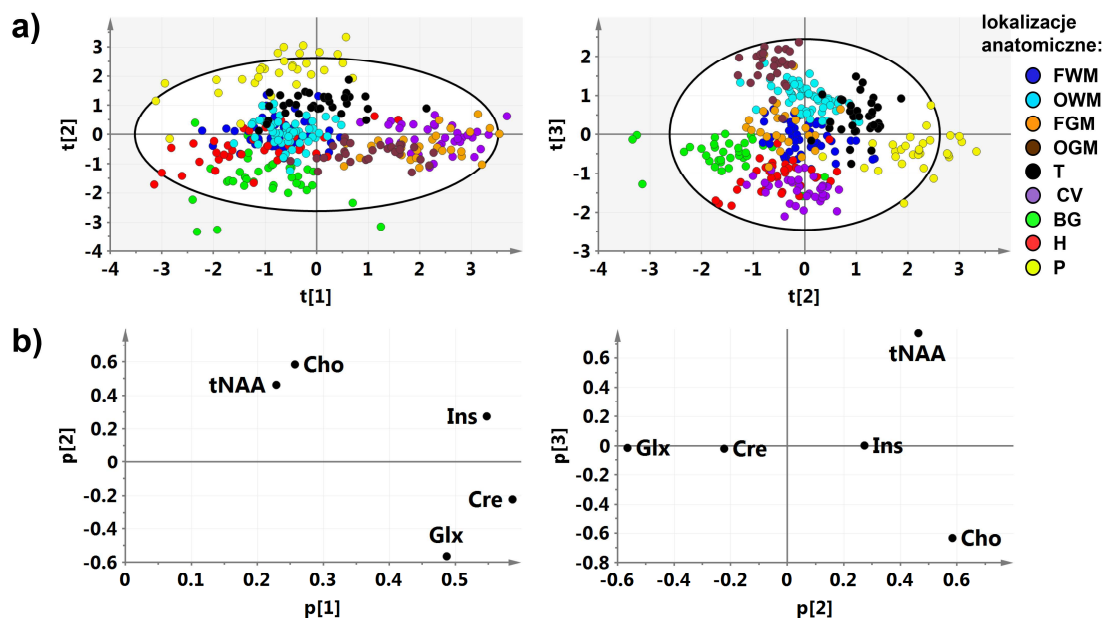
Rysunek 8. Poziomy metabolitów (średnie \pm odchylenia standardowe) dla różnych lokalizacji anatomicznych: (a) Cre, (b) Ins, (c) Cho, (d) Glx, (e) NAA+NAAG = tNAA, (f) udział grupy acetylowej NAA i NAAG w tNAA.

Oznaczenia lokalizacji anatomicznych: FWM – czołowa istota biała, OWM – potyliczna istota biała, FGM – czołowa istota szara, OGM – potyliczna istota szara, T – wzgórze, BG – jądra podstawne, P – most, CV – robak mózdku, H – hipokamp.

11.3.2 Analiza wielowymiarowa

Model PCA I

Rysunek 9 przedstawia wyniki analizy PCA poziomów metabolitów wyznaczonych z wykorzystaniem oprogramowania LCMoel (model PCA I). Frakcje całkowitej zmienności oraz frakcje zmienności wejściowych metabolitów wyjaśnione przez poszczególne składowe przedstawione są w tabeli 5.



Rysunek 9. Model PCA I: (a) wykres wartości czynnikowych t[1] – t[2] (z lewej strony) i t[2]-t[3] (z prawej strony); wykres ładunków czynnikowych p[1] – p[2] (z lewej strony) i p[2]-p[3] (z prawej strony).

Oznaczenia lokalizacji anatomicznych: FWM – czołowa istota biała, OWM – potyliczna istota biała, FGM – czołowa istota szara, OGM – potyliczna istota szara, T – wzgórze, BG – jądra podstawne, P – most, CV – robak mózdzku, H – hipokamp.

Składowa	R ² X [%]	R ² Cre [%]	R ² Ins [%]	R ² Cho [%]	R ² tNAA [%]	R ² Glx [%]
1	41.0	70.5	61.4	13.5	10.7	48.6
2	22.6	5.6	8.4	38.7	24.3	36.1
3	19.8	0.0	0.0	39.7	59.2	0.0

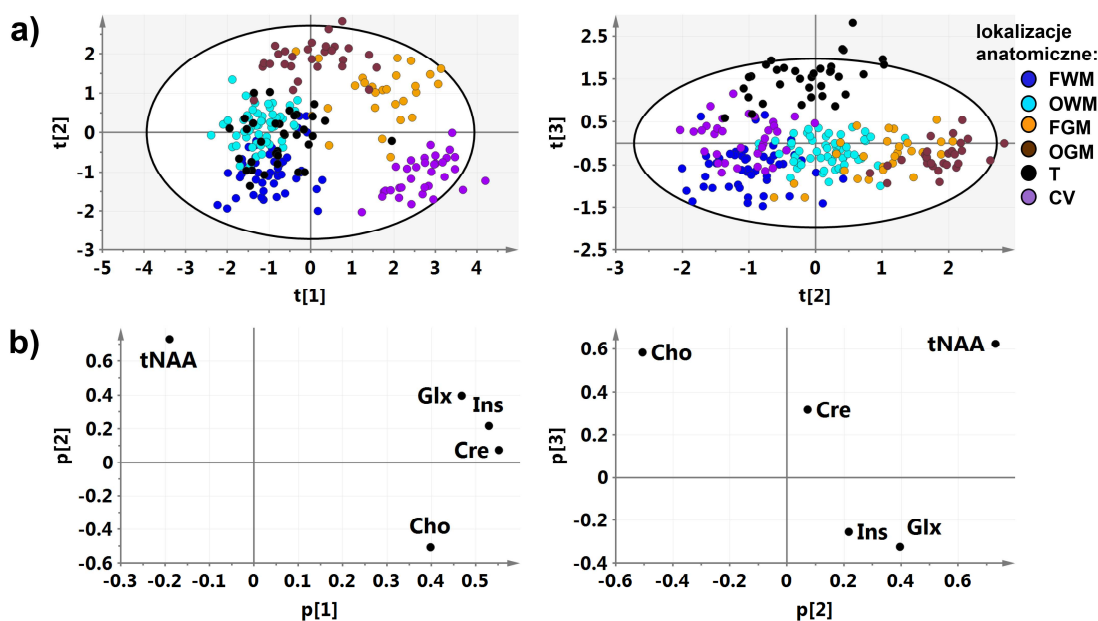
Tabela 5. Frakcje całkowitej zmienności (R²X) oraz frakcje zmienności wejściowych metabolitów (R²met, met = Cre, Ins, Cho, tNAA, Glx) wyjaśnione przez poszczególne składowe modelu PCA I.

Pierwszą składową można opisać głównie przez dodatnie ładunki czynnikowe dla Ins, Cre i Glx. Składowa ta pozwala rozróżnić widma zarejestrowane z czołowej istoty szarej, potylicznej istoty szarej i robaka mózdzku (scharakteryzowanych dodatnimi wartościami czynnikowymi) od widm zmierzonych z pozostałych lokalizacji anatomicznych. Wyniki analizy jednowymiarowej potwierdzają wysoki poziom Ins, Cre i Glx w czołowej i potylicznej istocie szarej oraz w robaku mózdzku (rysunek 8).

Płaszczyzna drugiej i trzeciej składowej modelu pozwala na ocenę zmienności tNAA i Cho. Drugą składową można opisać głównie przez dodatnie ładunki czynnikowe dla tNAA i Cho oraz ujemny wkład Glx. Widma zarejestrowane z mostu zostały scharakteryzowane najwyższymi wartościami czynnikowymi dla tej składowej, natomiast widma zmierzone z jader podstawnych – najniższymi. Rysunek 8 potwierdza wyższe wartości tNAA i Cho oraz niższe wartości Glx w moście niż w jadrach podstawnych. Trzecia składowa (opisana głównie przez dodatni ładunek czynnikowy dla tNAA oraz ujemny – dla Cho) pozwala na rozróżnienie widm zarejestrowanych z czołowej istoty szarej, potylicznej istoty szarej i robaka mózdzku (widma te nie mogły być rozróżnione na podstawie pierwszej składowej). Widma zarejestrowane z potylicznej istoty szarej można scharakteryzować najwyższymi wartościami czynnikowymi dla tej składowej, natomiast widma zarejestrowane z robaka mózdzku – najniższymi. Lokalizacja widm zmierzonych z wzgórza w pierwszej ćwiartce układu współrzędnych drugiej i trzeciej składowej wskazuje na wysoki poziom tNAA w tym obszarze mózgowia.

Model PCA II

Aby uzyskać lepszy wgląd w strukturę wariacji analizowanego zestawu danych, widma zarejestrowane z mostu, hipokampa i jader podstawnych – charakteryzujące się najwyższymi szerokościami połówkowymi – zostały wykluczone z kolejnego modelu PCA II. Rysunek 10 przedstawia wartości i ładunki czynnikowe uzyskane z analizy, a informacje na temat frakcji zmienności oryginalnych metabolitów odzwierciedlonych przez poszczególne składowe przedstawione są w tabeli 6. Na wykresach wartości czynnikowych widoczne jest rozdzielenie grup widm zarówno ze względu na lokalizację anatomiczną, jak i na rodzaj tkanki (istota szara, istota biała). Podobnie jak w modelu PCA I, pierwsza składowa może być scharakteryzowana głównie przez dodatnie ładunki czynnikowe dla Cre, Ins i Glx. W modelu II widoczny jest jednak większy wkład Cho do tej składowej niż w modelu I. Widma zarejestrowane z wzgórza nakładają się z widmami zmierzonymi z czołowej i potylicznej istoty białej na płaszczyźnie dwóch pierwszych składowych. Jednak, wyraźne rozróżnienie tego obszaru anatomicznego od pozostałych jest możliwe na podstawie trzeciej składowej zdominowanej przez dodatni wkład Cho i tNAA. Widma zmierzone ze wzgórza zostały scharakteryzowane najwyższymi wartościami czynnikowymi tej składowej.



Rysunek 10. Model PCA II: (a) wykres wartości czynnikowych t[1] – t[2] (z lewej strony) i t[2]-t[3] (z prawej strony); wykres ładunków czynnikowych p[1] – p[2] (z lewej strony) i p[2]-p[3] (z prawej strony).
Oznaczenia lokalizacji anatomicznych: FWM – czołowa istota biała, OWM – potyliczna istota biała, FGM – czołowa istota szara, OGM – potyliczna istota szara, T – wzgórze, CV – robak mózdzku.

Składowa	R ² X[%]	R ² Cre [%]	R ² Ins [%]	R ² Cho [%]	R ² tNAA [%]	R ² Glx [%]
1	50.9	77.7	71.4	40.3	9.2	55.8
2	24.4	0.7	5.7	31.2	65.2	19.1
3	12.7	6.3	4.2	21.6	24.6	6.7

Tabela 6. Frakcje całkowitej zmienności (R²X) oraz frakcje zmienności wejściowych metabolitów (R²met, met = Cre, Ins, Cho, tNAA, Glx) wyjaśnione przez poszczególne składowe modelu PCA II.

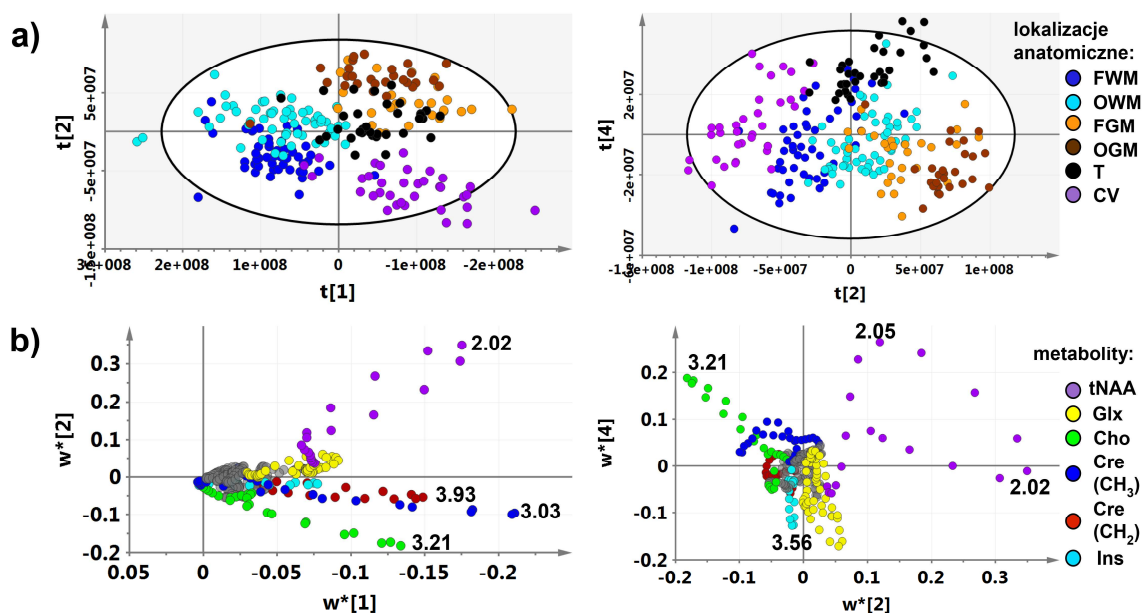
Model PLS-DA III

Wizualizacja różnic metabolicznych między lokalizacjami uwzględnionymi w modelu PCA II została również przeprowadzona przy pomocy analizy wielowymiarowej nierozdzielnych widm. W analizie tej wykorzystano nadzorowaną technikę PLS-DA. W związku z tym, że użycie tej techniki jest zalecane w rozwiązywaniu problemów klasyfikacyjnych obejmujących nie więcej niż 4 grupy [77], liczba rozróżnianych obszarów mózgowych została zredukowana na etapie konstrukcji modelu przez utworzenie grupy widm zarejestrowanych z istoty białej (powstałej przez połączenie widm zmierzonych z czołowej i potylicznej istoty białej) oraz utworzenie grupy widm zarejestrowanych z istoty szarej (powstałej przez połączenie widm zmierzonych z czołowej i potylicznej istoty szarej). Jednak, analiza rozrzutu wartości czynnikowych

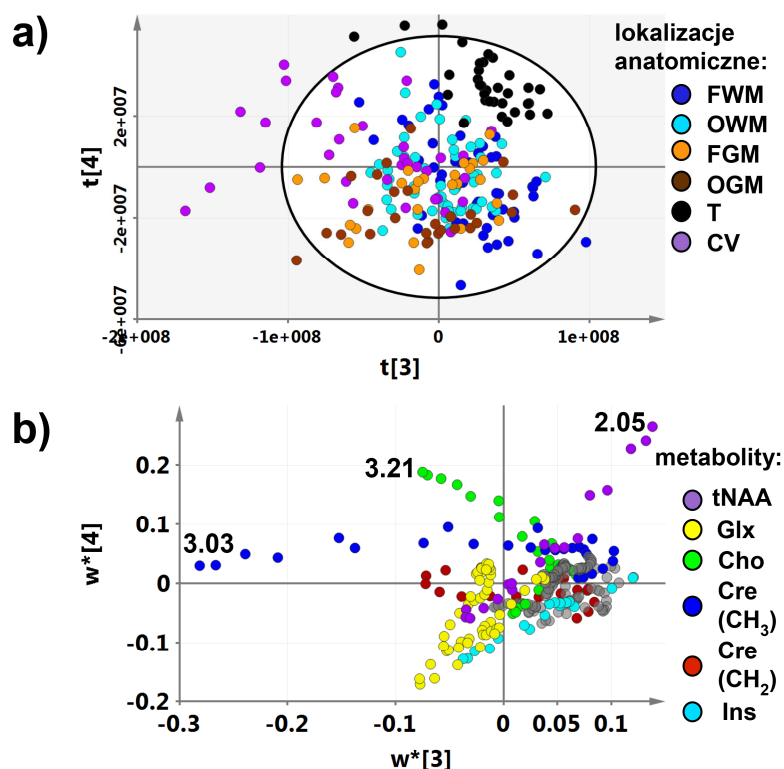
dla poszczególnych składowych modelu została przeprowadzona z zachowaniem oryginalnego podziału na obszary anatomiczne.

Model PLS-DA III można opisać następującymi parametrami: 4 składowe, $R^2X(\text{cum}) = 83,4\%$, $R^2Y(\text{cum}) = 71,5\%$, $Q^2Y(\text{cum}) = 69,9\%$. Rysunki 11 i 12 pokazują wykresy wartości czynnikowych i wag modelu, a zestawienie frakcji zmienności wyjaśnionych i przewidzianych przez poszczególne składowe modelu przedstawione jest w tabeli 7.

Pierwszą składową modelu można scharakteryzować głównie przez dodatnie ładunki czynnikowe dla sygnałów przy 3,03 i 3,93 ppm (grupy metylowej i metylenowej Cre), 3,21 ppm (grupy metylowej Cho) oraz 2,02 ppm (grupy acetylowej NAA). Składowa ta pozwala na rozróżnienie widm zarejestrowanych z czołowej i potylicznej istoty białej od widm zmierzonych z pozostałych lokalizacji anatomicznych. Analiza rozrzutu wartości czynnikowych dwóch pierwszych składowych wskazuje, że widma zarejestrowane z czołowej istoty szarej, potylicznej istoty szarej oraz wzgórza charakteryzują się stosunkowo wysokim sygnałem NAA. Natomiast wysoki poziom Cho i Cre są charakterystyczne dla robaka mózdzku. Wnioski te są zgodne z wynikami analizy jednowymiarowej (rysunek 8).



Rysunek 11. Model PLS-DA III: (a) wykresy wartości czynnikowych $t[1] - t[2]$ (z lewej strony) oraz $t[2] - t[4]$ (z prawej strony), (b) wykresy wag $w^*[1] - w^*[2]$ (z lewej strony) oraz $w^*[2] - w^*[4]$ (z prawej strony). Zakresy spektralne zaznaczone na wykresie wag: 1.9-2.11 ppm (tNAA), 2.12 - 2.5 ppm (Glx), 3.13 - 3.3 ppm (Cho), 2.93- 3.12 (Cre - CH₃), 3.86 - 4.0 ppm (Cre - CH₂), 3.46 - 3.6 ppm (Ins). Oznaczenia lokalizacji anatomicznych: FWM - czołowa istota biała, OWM - potyliczna istota biała, FGM - czołowa istota szara, OGM - potyliczna istota szara, T - wzgórze, CV - robak mózdzku.



Rysunek 12. Model PLS-DA III: (a) wykres wartości czynnikowych t[3] – t[4], (b) wykres wag w*[3]-w*[4]. Zakresy spektralne zaznaczone na wykresie wag: 1.9-2.11 ppm (tNAA), 2.12 - 2.5 ppm (Glx), 3.13 - 3.3 ppm (Cho), 2.93- 3.12 (Cre - CH₃), 3.86 - 4.0 ppm (Cre - CH₂), 3.46 – 3.6 ppm (Ins). Oznaczenia lokalizacji anatomicznych: FWM – czołowa istota biała, OWM – potyliczna istota biała, FGM – czołowa istota szara, OGM – potyliczna istota szara, T – wzgórze, CV – robak mózdzku.

Składowa	R ² X [%]	R ² Y [%]	Q ² Y [%]	Q ² Y (cum) [%]	R ²	R ²	R ²	R ²	R ²	R ²	R ²
					Cre (3.03 ppm) [%]	Ins (3.56 ppm) [%]	Cho (3.21 ppm) [%]	NAA (2.02 ppm) [%]	NAAG (2.05 ppm) [%]	Glx (2.29 ppm) [%]	Glx (2.37 ppm) [%]
1	53.4	25.9	25.6	25.6	71.4	70.3	46.0	42.4	25.6	83.5	75.8
2	14.8	20.9	27.3	45.9	0.9	2.7	26.9	49.7	28.1	1.9	3.6
3	11.7	9.6	17.2	55.2	19.4	0.3	2.3	2.4	12.5	2.1	3.7
4	3.5	15.1	32.8	69.9	1.4	0.5	10.4	0.0	23.9	3.7	8.3

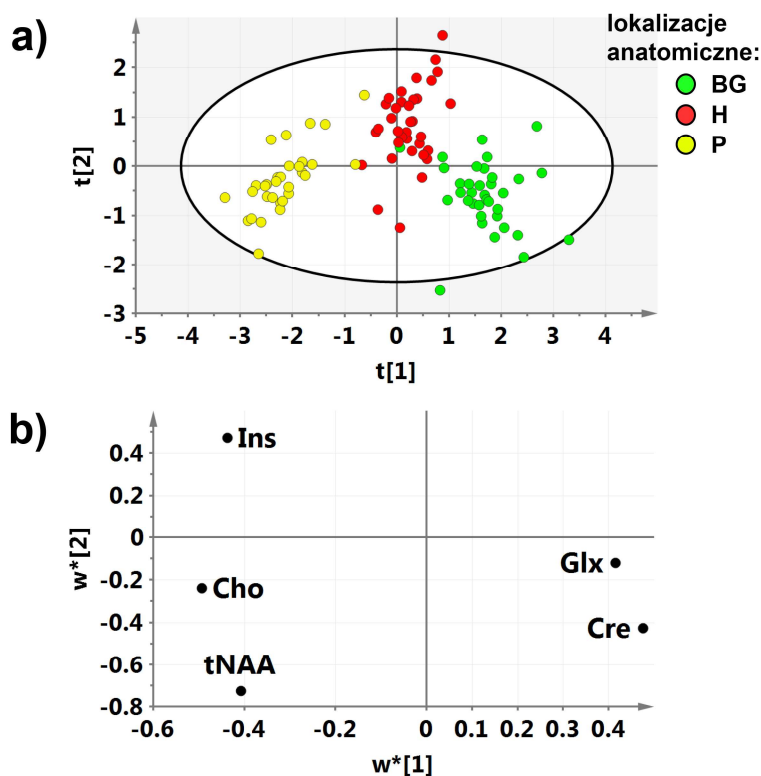
Tabela 7. Model PLS-DA III: Frakcje całkowitej zmienności X i Y wyjaśnione przez poszczególne składowe (R²X, R²Y), frakcja całkowitej zmienności Y przewidziana przez poszczególne składowe (Q²Y), skumulowana frakcja całkowitej zmienności Y przewidziana przez wyznaczone składowe (Q²Y(cum)) oraz frakcje zmienności wejściowych metabolitów (R²met, met = Cre, Ins, Cho, NAA, NAAG, Glx) wyjaśnione przez poszczególne składowe modelu PLS-DA III.

Na uwagę zasługuje podobieństwo między wykresem wartości czynnikowych drugiej i czwartej składowej modelu PLS-DA III a wykresem wartości czynnikowych drugiej i trzeciej składowej modelu PCA II. Analiza wielowymiarowa nierozdzielonych widm wskazuje, że sygnał przy 2,05 ppm (opowiadający grupie acetylowej NAAG) ma istotne znaczenie w odróżnieniu wzgórza od innych lokalizacji mózgowych. Wniosek

ten jest potwierdzony również na wykresie trzeciej i czwartej składowej modelu reprezentującej 36,4 % całkowitej zmienności NAAG oraz zgodny z wynikami analizy jednowymiarowej (rysunek 8).

Modele PLS-DA IV i V

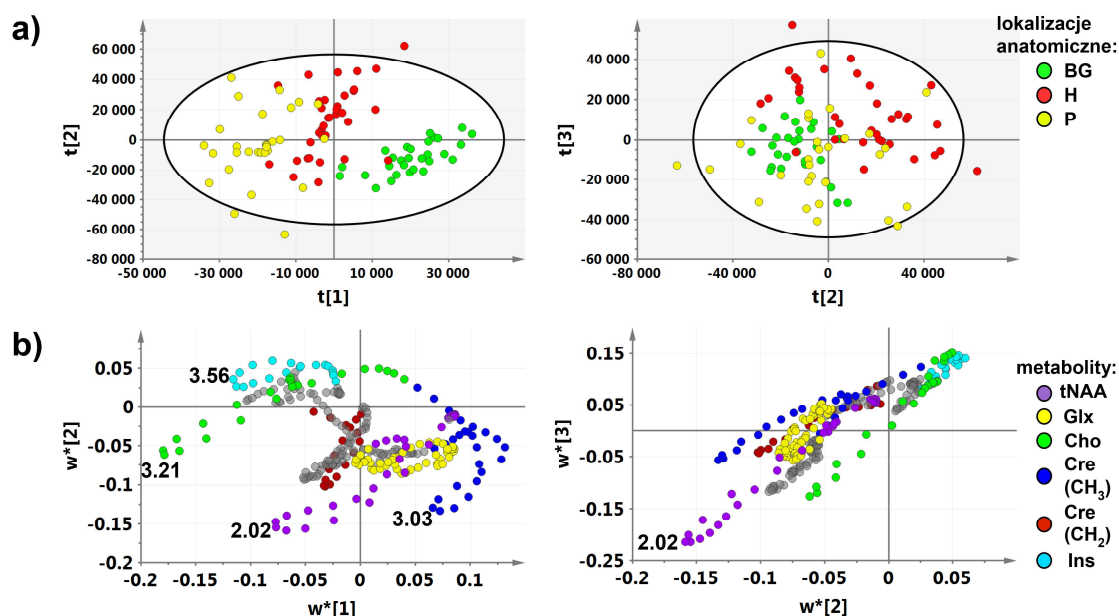
Wielowymiarowe metody analizy danych zostały również wykorzystane w wizualizacji różnic metabolicznych między obszarami mózgu charakteryzującymi się najwyższymi szerokościami połówkowymi widm ^1H MRS w analizowanym zestawie danych (most, jądra podstawne, hipokamp). Analiza PLS-DA stężeń wyznaczonych przy pomocy oprogramowania LCMoDel (model PLS-DA IV) wykazała, że płaszczyzna dwóch pierwszych składowych ($R^2\text{X(cum)} = 75,5\%$, $R^2\text{Y(cum)} = 66,5\%$, $Q^2\text{Y(cum)} = 65,1\%$) jest przydatna w rozróżnieniu wymienionych lokalizacji (rysunek 13).



Rysunek 13. Model PLS-DA IV: (a) wykres wartości czynnikowych t[1] – t[2]; (b) wykres wag w*[1] – w*[2]. Oznaczenia lokalizacji anatomicznych: BG – jądra podstawne, P – most, H – hipokamp.

Porównanie wykresów wartości czynnikowych oraz wag wskazuje, że wysoki poziom Glx oraz Cre są charakterystyczne dla widm zarejestrowanych z jąder podstawnych. Natomiast widma zmierzone z mostu odznaczają się wysokim poziomem tNAA i Cho. Ponadto, jądra podstawne można odróżnić od mostu na podstawie wyższego poziomu

Ins w pierwszej z wymienionych lokalizacji. Wnioski uzyskane z analizy wielowymiarowej poziomów metabolitów zostały potwierdzone w analizie pełnych nierozdzielonych widm (model PLS-DA V). Uzyskany model można opisać następującymi parametrami: liczba składowych: 3, $R^2X(\text{cum}) = 79.4\%$, $R^2Y(\text{cum}) = 63.6\%$, $Q^2Y(\text{cum}) = 58.6\%$. Wykresy wartości czynnikowych oraz wag modelu przedstawione są na rysunku 14.



Rysunek 14. Model PLS-DA V: (a) wykres wartości czynnikowych $t[1] - t[2]$ (z lewej strony) i $t[2] - t[3]$ (z prawej strony); (b) wykres wag $w^*[1] - w^*[2]$ (z lewej strony) i $w^*[2] - w^*[3]$ (z prawej strony). Zakresy spektralne zaznaczone na wykresie wag: 1.9-2.11 ppm (tNAA), 2.12 - 2.5 ppm (Glx), 3.13 - 3.3 ppm (Cho), 2.93- 3.12 (Cre - CH_3), 3.86 - 4.0 ppm (Cre - CH_2), 3.46 – 3.6 ppm (Ins). Oznaczenia lokalizacji anatomicznych: BG – jądra podstawne, P – most, H – hipokamp.

Zestawienia frakcji wariancji wyjaśnionych i przewidzianych przez poszczególne składowe modeli PLS-DA IV i V przedstawione są w tabelach 8 i 9, odpowiednio.

Składowa	R^2X [%]	R^2Y [%]	Q^2Y [%]	Q^2Y (cum) [%]	$R^2\text{Cre}$ [%]	$R^2\text{Ins}$ [%]	$R^2\text{Cho}$ [%]	$R^2\text{tNAA}$ [%]	$R^2\text{Glx}$ [%]
1	55.3	44.4	44.1	44.1	42.9	57.3	71.5	51.8	53.0
2	20.2	22.1	37.6	65.1	32.8	5.2	14.9	43.5	4.4

Tabela 8. Model PLS-DA IV: Frakcje całkowitej zmienności X i Y wyjaśnione przez poszczególne składowe (R^2X , R^2Y), frakcja całkowitej zmienności Y przewidziana przez poszczególne składowe (Q^2Y), skumulowana frakcja całkowitej zmienności Y przewidziana przez wyznaczone składowe ($Q^2(\text{cum})$) oraz frakcje zmienności wejściowych metabolitów ($R^2\text{met}$, met = Cre, Ins, Cho, tNAA, Glx) wyjaśnione przez poszczególne składowe modelu.

Składowa	R ² X	R ² Y	Q ² Y	Q ² Y	R ²	R ²	R ²	R ²	R ²	R ²	R ²
	[%]	[%]	[%]	(cum)	Cre	Ins	Cho	NAA	NAAG	Glx	Glx
				[%]	(3.03	(3.56	(3.21	(2.02	(2.05	(2.29	(2.37
					ppm)	ppm)	ppm)	ppm)	ppm)	ppm)	ppm)
					[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
1	17.4	38.8	35.3	35.3	2.0	52.2	67.6	19.1	0.0	7.5	12.2
2	41.0	11.6	16.1	45.7	65.5	22.4	20.1	41.4	51.2	78.3	68.5
3	21.0	13.2	23.8	58.6	2.5	11.0	4.1	26.4	5.5	2.0	2.9

Tabela 9. Model PLS-DA V: Frakcje całkowitej zmienności X i Y wyjaśnione przez poszczególne składowe (R²X, R²Y), frakcja całkowitej zmienności Y przewidziana przez poszczególne składowe (Q²Y), skumulowana frakcja całkowitej zmienności Y przewidziana przez wyznaczone składowe (Q²Y(cum)) oraz frakcje zmienności wejściowych metabolitów (R²met, met = Cre, Ins, Cho, NAA, NAAG, Glx) wyjaśnione przez poszczególne składowe modelu PLS-DA V.

Modele PLS-DA VII i VII.

Analiza danych zawartych w tabeli 4 wskazuje na podobny skład tkankowy w objętościach spektroskopowych lokalizowanych w czołowej i potylicznej istocie białej. Natomiast znormalizowana frakcja istoty szarej w obszarach zainteresowania położonych w czołowej istocie szarej (0.86 ± 0.05) była wyższa niż w objętościach lokalizowanych w potylicznej istocie szarej (0.7 ± 0.08). W tabeli 10 przedstawiono zależności między poziomami metabolitów a znormalizowaną frakcją istoty szarej dla lokalizacji czołowej (dodatnia zależność dla wszystkich ocenianych metabolitów) i potylicznej (dodatnia zależność dla wszystkich poziomów metabolitów z wyjątkiem związków cholinowych).

Lokalizacja anatomiczna	Metabolit	Równanie regresji	R ² [%]	Wartość p
Lokalizacja czołowa	Cre	$Y = 2.17 \cdot x + 3.43$	78.46	0.0000
	Ins	$Y = 1.88 \cdot x + 2.51$	57.43	0.0000
	Cho	$Y = 0.18 \cdot x + 1.14$	10.69	0.0042
	tNAA	$Y = 1.37 \cdot x + 5.30$	43.05	0.0000
	Glx	$Y = 5.46 \cdot x + 3.23$	78.08	0.0000
Lokalizacja potyliczna	Cre	$Y = 2.05 \cdot x + 3.73$	71.44	0.0000
	Ins	$Y = 1.41 \cdot x + 2.68$	40.17	0.0000
	Cho	$Y = -0.28 \cdot x + 1.03$	18.27	0.0000
	tNAA	$Y = 1.51 \cdot x + 6.07$	49.84	0.0000
	Glx	$Y = 5.24 \cdot x + 2.77$	68.19	0.0000

Tabela 10. Wyniki analizy regresji liniowej poziomów metabolitów w funkcji znormalizowanej frakcji istoty szarej w obszarach zainteresowania.

W tabeli 11 przedstawiono stosunki poziomów metabolitów w istocie szarej względem istoty białej (współczynniki GM/WM) dla lokalizacji czołowej i potylicznej oraz stosunki poziomów metabolitów w lokalizacji czołowej względem lokalizacji

potylicznej (współczynniki F/O). Rozważono zarówno poziomy metabolitów wyznaczone na podstawie równania 1, jak i poziomy metabolitów odpowiadające 100-procentowej zawartości istoty szarej i 100-procentowej zawartości istoty białej w objętościach pomiarowych (wyznaczonych metodą ekstrapolacji).

Metabolit	Współczynnik GM/WM ^a		Współczynnik F/O ^b	
	F	O	WM	GM
Cre	1.35 ± 0.16	1.21 ± 0.12	0.92 ± 0.11	1.03 ± 0.10
	1.63 ± 0.20	1.55 ± 0.14	0.92 ± 0.12	0.97 ± 0.08
Ins	1.42 ± 0.30	1.20 ± 0.20	0.96 ± 0.20	1.13 ± 0.20
	1.76 ± 0.40	1.53 ± 0.26	0.94 ± 0.22	1.08 ± 0.17
Cho	1.10 ± 0.22	0.84 ± 0.18	1.22 ± 0.21	1.59 ± 0.36
	1.16 ± 0.23	0.71 ± 0.17	1.09 ± 0.18	1.81 ± 0.47
tNAA	1.16 ± 0.14	1.11 ± 0.08	0.87 ± 0.08	0.91 ± 0.09
	1.27 ± 0.15	1.26 ± 0.09	0.87 ± 0.08	0.88 ± 0.09
Glx	1.77 ± 0.45	1.54 ± 0.40	1.08 ± 0.32	1.24 ± 0.25
	2.67 ± 0.77	2.86 ± 0.88	1.16 ± 0.46	1.09 ± 0.16

Tabela 11. Charakterystyka metaboliczna lokalizacji czołowej i potylicznej.

^astosunek poziomów metabolitów w istocie szarej (GM) względem istoty białej (WM)

^bstosunek poziomów metabolitów w lokalizacji czołowej (F) względem lokalizacji potylicznej (O)

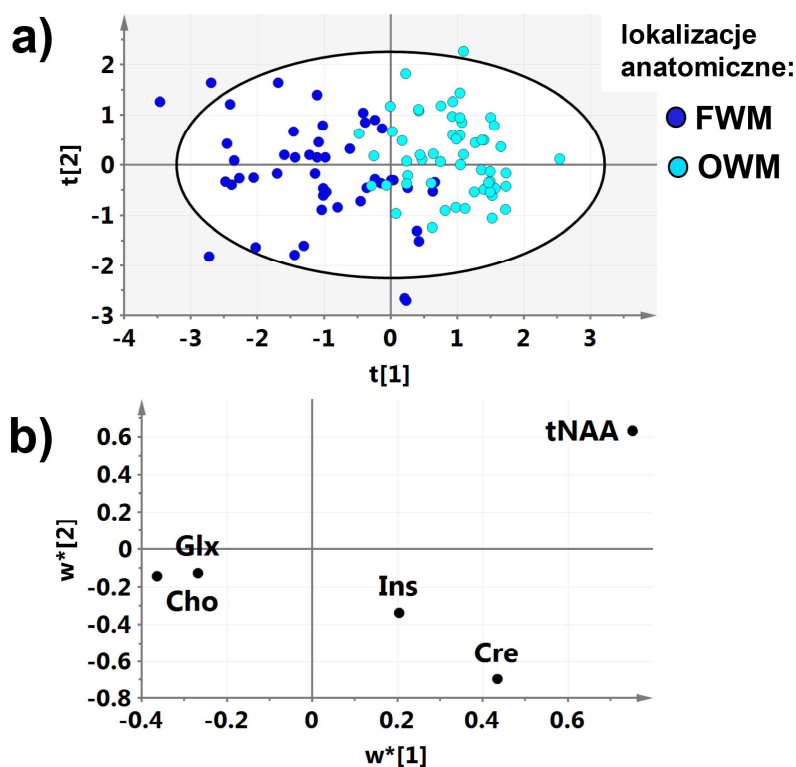
Współczynniki na cieniowanych polach zostały obliczone w oparciu o poziomy metabolitów wyznaczone zgodnie z równaniem 1, a współczynniki na niecieniowanych polach zostały obliczone na podstawie poziomów metabolitów odpowiadających 100-procentowej zawartości istoty szarej lub białej.

Współczynniki GM/WM ekstrapolowanych poziomów metabolitów przyjmowały wartości od 1,16 (Cho) do 2,67 (Glx) dla lokalizacji czołowej oraz od 0,71 (Cho) do 2,86 (Glx) dla lokalizacji potylicznej.

Przeprowadzona analiza wykazała także, że poziom cholicy jest o 81% wyższy, a poziom tNAA o 14% niższy w czołowej istocie szarej niż w potylicznej istocie szarej (biorąc pod uwagę ekstrapolowane wartości). Natomiast widma zarejestrowane z czołowej istoty białej wykazały niższy poziom kreatyny (F/O = 0,92 ± 0,11) i tNAA (F/O = 0,87 ± 0,08) niż widma zmierzone z potylicznej istoty białej (zarówno dla poziomów metabolitów wyznaczonych na podstawie równania 1, jak i na podstawie ekstrapolacji). Współczynnik F/O obliczony na podstawie równania 1 dla związków cholinowych w obszarach zawierających głównie istotę białą wynosił 1,22 ± 0,21. Jednak, lokalizacyjne różnice w zależnościach poziomu Cho od składu tkankowego powodują, że współczynnik ten wyznaczony na podstawie ekstrapolowanych wartości jest niższy (F/O = 1.09 ± 0,18). Stosunkowo wysoka wartość współczynnika F/O obliczonego na podstawie równania 1 dla Glx w objętościach zawierających głównie

istotę szarą ($1,24 \pm 0,25$) odzwierciedla różnice w składzie tkankowym obszarów zainteresowania i ulega redukcji po ekstrapolacji ($1,09 \pm 0,16$).

Różnice metaboliczne między lokalizacją czołową i potyliczną zostały również przedstawione z użyciem analizy PLS-DA ekstrapolowanych poziomów metabolitów odpowiadających 100-procentowej zawartości istoty białej lub istoty szarej w objętościach pomiarowych. Na rysunku 15 pokazano wykres wartości czynnikowych oraz wag modelu PLS-DA VI ($R^2X(\text{cum}) = 54.5\%$, $R^2Y(\text{cum}) = 63.2\%$, $Q^2Y(\text{cum}) = 59.2\%$, liczba składowych: 2), rozróżniającego widma zarejestrowane z czołowej istoty białej od widm zmierzonych z potylicznej istoty białej. Zestawienie frakcji zmienności wyjaśnionych i przewidzianych przez składowe modelu przedstawione jest w tabeli 12. Uzyskane rozseparowanie można głównie wytłumaczyć wyższym poziomem tNAA i Cre w okolicy potylicznej (zgodnie z tabelą 11).

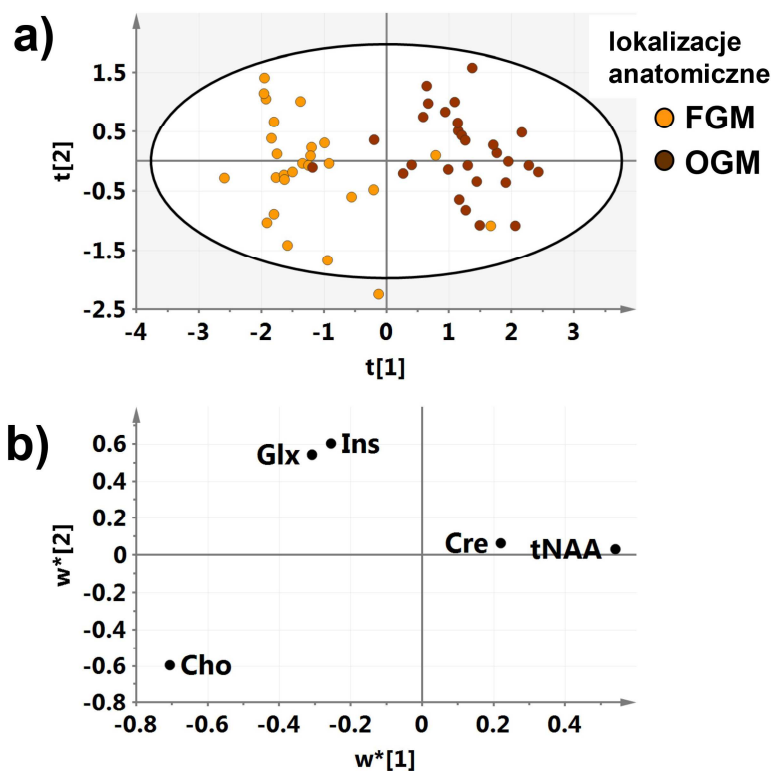


Rysunek 15. Model PLS-DA VI: (a) wykres wartości czynnikowych t[1] – t[2]; (b) wykres wag w*[1] – w*[2]. Oznaczenia lokalizacji anatomicznych: FWM – czołowa istota biała, OWM – potyliczna istota biała.

Składowa	R ² X [%]	R ² Y [%]	Q ² Y [%]	Q ² Y (cum) [%]	R ² Cre [%]	R ² Ins [%]	R ² Cho [%]	R ² tNAA [%]	R ² Glx [%]
1	34.3	58.9	56.9	56.9	56.2	12.5	20.3	72.0	10.7
2	20.2	4.3	5.3	59.2	33.1	45.4	9.1	13.3	0

Tabela 12. Model PLS-DA VI: Frakcje całkowitej zmienności X i Y wyjaśnione przez poszczególne składowe (R²X, R²Y), frakcja całkowitej zmienności Y przewidziana przez poszczególne składowe (Q²Y), skumulowana frakcja całkowitej zmienności Y przewidziana przez wyznaczone składowe (Q²Y(cum)) oraz frakcje zmienności wejściowych metabolitów (R²met, met = Cre, Ins, Cho, tNAA, Glx) wyjaśnione przez poszczególne składowe modelu.

Model PLS-DA VII został natomiast skonstruowany w oparciu o ekstrapolowane poziomy metabolitów odpowiadające 100-procentowej zawartości istoty szarej w objętościach pomiarowych lokalizowanych w obszarach czołowych i potylicznych. Na rysunku 16 pokazano wykres wartości czynnikowych oraz wag modelu PLS-DA VII (R²X(cum) = 70.2%, R²Y(cum) = 72.4%, Q²Y(cum) = 67,5%, 2 składowe), a w tabeli 13 przedstawiono frakcje zmienności wyjaśnionych i przewidzianych przez model. Uzyskane pogrupowanie można głównie wytłumaczyć wyższym poziomem Cho i niższym poziomem tNAA w okolicy czołowej niż w potylicznej (zgodnie z tabelą 11).



Rysunek 16 . Model PLS-DA VII: (a) wykres wartości czynnikowych t[1] – t[2]; (b) wykres wag w*[1] – w*[2]. Oznaczenia lokalizacji anatomicznych: FGM – czołowa istota szara, OGM – potyliczna istota szara.

Składowa	R ² X [%]	R ² Y [%]	Q ² Y [%]	Q ² Y (cum) [%]	R ² Cre [%]	R ² Ins [%]	R ² Cho [%]	R ² tNAA [%]	R ² Glx [%]
1	44.7	68.1	65.3	65.3	10.2	25.1	90.1	65.4	32.4
2	25.5	4.26	6.3	67.5	39.6	43.9	0	11.5	32.4

Tabela 13. Model PLS-DA VII: Frakcje całkowitej zmienności X i Y wyjaśnione przez poszczególne składowe (R²X, R²Y), frakcja całkowitej zmienności Y przewidziana przez poszczególne składowe (Q²Y), skumulowana frakcja całkowitej zmienności Y przewidziana przez wyznaczone składowe (Q²Y(cum)) oraz frakcje zmienności wejściowych metabolitów (R²met, met = Cre, Ins, Cho, tNAA, Glx) wyjaśnione przez poszczególne składowe modelu.

Wysoka jakość modeli PLS-DA III-VII została potwierdzona przy pomocy testów permutacyjnych.

11.4 Dyskusja

Technika ¹H MRS *in vivo* była wykorzystana w wielu pracach poświęconych określeniu niejednorodności metabolicznej mózgowia [57-60]. Jednak, stosowanie różnych parametrów akwizycji (np. TE, TR), dekompozycji (np. LCModel, Tarquin) i normalizacji widm sprawia, że wyniki uzyskane przez różne grupy badaczy nie są zgodne. Ponadto, techniki analizy danych stosowane w tych pracach ograniczone były do metod jednowymiarowych. Wyniki wielowymiarowej analizy dużej bazy widm zarejestrowanych z różnych lokalizacji anatomicznych u zdrowych ochotników stanowią cenne źródło informacji na temat zależności biochemicznych między określonymi obszarami mózgowia oraz między metabolitami.

Pierwsza główna składowa modelu skonstruowanego w oparciu o poziomy metabolitów wyznaczone z użyciem oprogramowania LCModel zdominowana była przez Glx, Cre i Ins. Składowa ta okazała się przydatna w odróżnieniu czołowej istoty szarej, potylicznej istoty szarej oraz robaka mózdzku od pozostałych lokalizacji. Wariacje tNAA i Cho zostały odzwierciedlone przez drugą i trzecią składową modelu, przy czym druga składowa wyjaśniała także znacząca część wariacji Glx. Płaszczyzna drugiej i trzeciej składowej zwizualizowała różnice metaboliczne między mostem a jądrami podstawnymi i między czołową istotą szarą, potyliczną istotą szarą i robakiem mózdzku. Wartości czynnikowe widm zarejestrowanych z hipokampa, wzgórza i jąder podstawnych utworzyły na tej płaszczyźnie skupiska. W związku z tym, że szerokości połówkowe widm ¹H MRS *in vivo* są zależne od lokalizacji anatomicznej, a poziomy metabolitów wyznaczone z użyciem oprogramowania LCModel z nimi korelują [78], opracowano oddzielne modele wielowymiarowe dla lokalizacji znacznie różniących się

jakością widm. Modele te były użyteczne w wizualizacji różnic biochemicznych między różnymi obszarami mózgowia.

Poziomy metabolitów odpowiadające 100-procentowej zawartości istoty szarej lub białej w objętościach pomiarowych były wyznaczane w wielu pracach przy pomocy techniki CSI [82-84]. Chociaż metoda ta umożliwia osiągnięcie wyższej rozdzielczości przestrzennej niż technika SV, efekt uśrednienia objętościowego sygnałów ^1H MRS *in vivo* pochodzących z różnych struktur mózgowych komplikuje możliwość bezpośredniego pomiaru stężeń w istocie szarej lub białej. Dlatego stężenia te są zwykle szacowane metodą ekstrapolacji zależności między poziomami metabolitów a znormalizowaną frakcją istoty szarej. Jednak, wyznaczanie tych relacji na podstawie analizy wielu widm ^1H MRS *in vivo* rejestrowanych u tego samego ochotnika przy użyciu techniki CSI z rozległych obszarów mózgowia obejmujących często różniące się biochemicznie lokalizacje może prowadzić do błędnych interpretacji. Na przykład Wiedermann i wsp. [84] wyznaczyli 2-krotnie niższy poziom Cho w czołowej i ciemieniowej istocie szarej niż w istocie białej, dla której zaniedbano różnice lokalizacyjne (np. spadek poziomu choliny w istocie białej w kierunku przednio-tylnym opisany przez Baker i wsp. [57]). Poza dużym kontrastem w poziomie Cho, Wiederman i wsp. opisali stosunkowo niewielkie różnice w poziomach pozostałych metabolitów między istotą szarą i białą. W niniejszej pracy stwierdzono znacząco wyższe poziomy Glx, Cre i Ins w czołowej i potylicznej istocie szarej względem istoty białej oraz niższy kontrast dla tNAA. Wyniki te są zgodne z rezultatami otrzymanymi przez Gasparovica i wsp. [82] oraz McLean i wsp. [83], którzy wykorzystali metodę ekstrapolacji w analizie widm zarejestrowanych przy użyciu techniki CSI z rozległego obszaru nadkomorowej istoty białej oraz istoty szarej. Autorzy ci nie wykazali jednak różnic w poziomie Cho między tymi tkankami.

Wyznaczenie poziomów metabolitów odpowiadających 100-procentowej zawartości istoty białej lub istoty szarej w objętościach pomiarowych metodą ekstrapolacji zależności między poziomami metabolitów wyznaczonych z użyciem techniki SV a znormalizowaną frakcją istoty szarej pozwala na uwzględnienie różnic lokalizacyjnych. Podejście to jest jednak nieczęsto stosowane. W wielu pracach nie przeprowadzono segmentacji obrazów anatomicznych [57,58] albo segmentację wykonano wyłącznie w celu potwierdzenia podobieństwa składu tkankowego analizowanych obszarów zainteresowania (nie przeprowadzono ekstrapolacji) [85,86]. Zhang i wsp. [86] oraz van der Veen i wsp. [85] wykazali wyższy poziom Cho oraz

niższy poziom tNAA w lokalizacji czołowej niż w lokalizacji potylicznej w objętościach pomiarowych zawierających zarówno istotę szarą, jak i białą. W niniejszej pracy otrzymano podobny wynik dla obszarów zainteresowania odpowiadających 100-procentowej zawartości istoty szarej. Natomiast, ekstrapolowane poziomy Cho odpowiadające całkowitemu udziałowi istoty białej nie różnią się między lokalizacją czołową i potyliczną. Pouwels i wsp. [58] otrzymali wyższy poziom tNAA w okolicy czołowej niż w okolicy potylicznej (zarówno w istocie białej, jak i szarej), co zostało potwierdzone w niniejszej pracy.

Analizy wielowymiarowe wykazały, że stosunkowo wysoki poziom Cho i niski poziom tNAA to cechy, które pozwalają odróżnić robaka mózdzku od lokalizacji czołowej, potylicznej oraz wzgórza. Natomiast wysoki poziom zarówno Cho, jak i tNAA we wzgórzu różnicują tę lokalizację od obszaru czołowego, potylicznego oraz robaka mózdzku. Wyniki te są zgodne z rezultatami uzyskanymi przez Baker i wsp. [57] oraz przez Emira i wsp. [60]. W niniejszej pracy wykazano, że wysoki poziom NAAG jest obserwowany we wzgórzu, co zostało też potwierdzone przy użyciu techniki LC/MS [87].

Chociaż w niewielu publikacjach opisane są różnice metaboliczne między mostem i jądrami podstawnymi, wyniki uzyskane w niniejszej pracy zgodne są z rezultatami badań przeprowadzonych przez Emira i wsp. [60], którzy otrzymali wyższy poziom Ins, tNAA i Cho oraz niższy poziom Cre i Glx w moście niż w jądrach podstawnych. W niniejszej pracy wykazano stosunkowo niski poziom tNAA w hipokampie – zgodnie z danymi literaturowymi [88]. Z kolei Choi i wsp. zaobserwowali, że poziom Ins i Cho w tym obszarze jest wyższy niż w czołowej i potylicznej istocie szarej, a poziom Cre – porównywalny w tych trzech lokalizacjach [88]. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy są zgodne z rezultatami badań Minati i wsp. [59], którzy otrzymali podobne poziomy Cre, Ins i Cho w hipokampie i istocie białej. Niska między-ośrodkowa powtarzalność pomiarów ^1H MRS *in vivo* dla obszarów spektroskopowych lokalizowanych w płacie skroniowym [89] oraz duża zmienność udziału różnych tkanek w tych obszarach (związana z małą objętością hipokampa: 2-3 cm³) powodują, że wyniki uzyskane w różnych badaniach nie są zgodne. Dodatkowo, niska jakość widm rejestrowanych z obszaru hipokampa utrudnia ich rzetelne porównanie z innymi lokalizacjami.

Wysoka powtarzalność poziomów metabolitów skalowanych do nietłumionego sygnału wody wynika z tego, że w technice tej wyeliminowany jest wpływ czynników

związanych z niejednorodnością pola B1, zmiennością załadowania cewki oraz niestabilnością pracy skanera MRI [90]. Jednak, rzetelność wyników zależy od poprawności przyjętych założeń na temat stężenia i czasów relaksacji wody oraz od dokładności wyznaczenia objętościowych frakcji tkanek zawartych w obszarach zainteresowania. Największym ograniczeniem przeprowadzonych badań jest brak T1-zależnych obrazów o wysokiej rozdzielczości dla ochotników uczestniczących w projekcie I, który był poświęcony charakterystyce metabolicznej istoty białej. Objętościowe frakcje istoty szarej, białej oraz płynu mózgowo-rdzeniowego w okolicach czołowej i potylicznej istoty białej zostały wyznaczone na podstawie obrazów T2-zależnych o grubości warstwy 5 mm. Jednak, Gasparovich i wsp. [91] wykazali stosunkowo małą zależność między poziomami metabolitów w istocie białej a rodzajem obrazu MRI (T1 lub T2-zależne) wykorzystanego w segmentacji. Obszary pomiarowe badane w projekcie I były jednorodne pod względem składu tkankowego (głównie istota biała, znikomy udział płynu mózgowo-rdzeniowego), stąd zaakceptowano niższą rozdzielczość obrazów użytych w segmentacji.

11.5 Podsumowanie

W niniejszej pracy przedstawiono pierwszą próbę wyznaczenia współrzędnych metabolicznych różnych obszarów anatomicznych mózgowia u zdrowych ochotników w wielowymiarowej przestrzeni metabolitów zarejestrowanych przy użyciu techniki ^1H MRS *in vivo*. Wiedza na temat zależności biochemicznych między różnymi obszarami mózgowia oraz między metabolitami w tych obszarach umożliwia głębsze zrozumienie funkcji mózgu. Zastosowanie wielowymiarowych technik analizy danych będzie miało coraz większe znaczenie w związku z rosnącym zastosowaniem wysokich pól magnetycznych, rozwojem specjalistycznych sekwencji pomiarowych, pozwalających na pomiary większej liczby metabolitów, oraz w związku z potrzebą implementacji do zastosowań medycznych semi-automatycznych platform wspomagających diagnostykę.

12 Piśmiennictwo

1. Bloch F, Hansen WW, Packard M. Nuclear Induction. *Physical Review*, 1946;69:127-127.
2. Purcell EM., Torrey HC, Pound R. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review*, 1946; 69: 37-38.
3. Klose U. Measurement sequences for single voxel proton MR spectroscopy. *Eur J Radiol*. 2008;67:194-201.
4. Rae CD. A guide to the metabolic pathways and function of metabolites observed in human brain ¹H magnetic resonance spectra. *Neurochem Res*. 2014;39:1-36.
5. Yamasaki F, Kurisu K, Kajiwara Y, Watanabe Y, Takayasu T, Akiyama Y, Saito T, Hanaya R, Sugiyama K. Magnetic resonance spectroscopic detection of lactate is predictive of a poor prognosis in patients with diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro Oncol*. 2011;13:791-801.
6. Cecil KM. MR spectroscopy of metabolic disorders. *Neuroimaging Clin N Am*. 2006;16:87-116.
7. Moolenaar SH, van der Knaap MS, Engelke UF, Pouwels PJ, Janssen-Zijlstra FS, Verhoeven NM, Jakobs C, Wevers RA. In vivo and in vitro NMR spectroscopy reveal a putative novel inborn error involving polyol metabolism. *NMR Biomed*. 2001;14:167-76.
8. Di Costanzo A, Trojsi F, Tosetti M, Schirmer T, Lechner SM, Popolizio T, Scarabino T. Proton MR spectroscopy of the brain at 3 T: an update. *Eur Radiol*. 2007;17:1651-62.
9. Emir UE, Auerbach EJ, Van De Moortele PF, Marjańska M, Uğurbil K, Terpstra M, Tkáč I, Oz G. Regional neurochemical profiles in the human brain measured by ¹H MRS at 7 T using local B1 shimming. *NMR Biomed*. 2012; 25:152-60.
10. Provencher SW. Automatic quantitation of localized in vivo ¹H spectra with LCModel *NMR Biomed*. 2001;14:260-4.
11. Pouillet JB1, Sima DM, Van Huffel S. MRS signal quantitation: a review of time- and frequency-domain methods. *J Magn Reson*. 2008;195(2):134-44.

12. Provencher SW. LCMModel & LCMgui user's manual. LCMModel Web Site. <http://s-provencher.com/pub/LCMModel/manual/manual.pdf> (dostęp 20.05.2016 r.)
13. Helms G. The principles of quantification applied to in vivo proton MR spectroscopy. *Eur J Radiol.* 2008;67:218-29.
14. Abbas Z, Gras V, Möllenhoff K, Keil F, Oros-Peusquens AM, Shah NJ. Analysis of proton-density bias corrections based on T1 measurement for robust quantification of water content in the brain at 3 Tesla. *Magn Reson Med.* 2014;72:1735-45.
15. Wansapura JP, Holland SK, Dunn RS, Ball WS Jr. NMR relaxation times in the human brain at 3.0 tesla. *J Magn Reson Imaging.* 1999;9:531-8.
16. Tisell A, Leinhard OD, Warntjes JB, Lundberg P. Procedure for quantitative (1)H magnetic resonance spectroscopy and tissue characterization of human brain tissue based on the use of quantitative magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med.* 2013;70:905-15.
17. Chance B, Nakase Y, Bond M, Leigh JS, Jr, McDonald G. Detection of 31P nuclear magnetic resonance signals in brain by in vivo and freeze-trapped assays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75:4925-4929.
18. Horská A, Barker PB. Imaging of brain tumors: MR spectroscopy and metabolic imaging. *Neuroimaging Clin N Am.* 2010;20:293-310.
19. Krsek P, Hajek M, Dezortova M, Jiru F, Skoch A, Marusic P, Zamecnik J, Kyncl M, Tichy M, Komarek V. (1)H MR spectroscopic imaging in patients with MRI-negative extratemporal epilepsy: correlation with ictal onset zone and histopathology. *Eur Radiol.* 2007;17:2126-35.
20. Mosconi E, Sima DM, Osorio Garcia MI, Fontanella M, Fiorini S, Van Huffel S, Marzola P. Different quantification algorithms may lead to different results: a comparison using proton MRS lipid signals. *NMR Biomed.* 2014;27:431-43.
21. Howells SL, Maxwell RJ, Howe FA, Peet AC, Stubbs M, Rodrigues LM, Robinson SP, Baluch S, Griffiths JR. Pattern recognition of 31P magnetic resonance spectroscopy tumour spectra obtained in vivo. *NMR Biomed.* 1993;6:237-241.
22. Hagberg G. From magnetic resonance spectroscopy to classification of tumors. A review of pattern recognition methods. *NMR Biomed.* 1998;11:148-156.

23. Luts J, Pouillet JB, Garcia-Gomez JM, Heerschap A, Robles M, Suykens JA, Van Huffel S. Effect of feature extraction for brain tumor classification based on short echo time 1H MR spectra. *Magn. Reson. Med.* 2008;60:288–298.
24. Ladroue C, Howe FA, Griffiths JR, Tate AR. Independent component analysis for automated decomposition of in vivo magnetic resonance spectra. *Magn. Reson. Med.* 2003;50:697–703.
25. Underwood J, Tate AR, Luckin R, Majós C, Capdevila A, Howe F, Griffiths J, Arús C. A prototype decision support system for MR spectroscopy-assisted diagnosis of brain tumours. *Stud Health Technol Inform.* 2001;84:561-5.
26. Julià-Sapé M, Griffiths JR, Tate RA, Howe FA, Acosta D, Postma G, Underwood J, Majós C, Arús C. Classification of brain tumours from MR spectra: the INTERPRET collaboration and its outcomes. *NMR Biomed.* 2015;28:1772-87.
27. <http://gabrmn.uab.es/?q=dss> (dostęp: 20.05.2016 r.)
28. Pérez-Ruiz A, Julià-Sapé M, Mercadal G, Olier I, Majós C, Arús C. The INTERPRET Decision-Support System version 3.0 for evaluation of Magnetic Resonance Spectroscopy data from human brain tumours and other abnormal brain masses. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:581.
29. van der Graaf M, Julia-Sape M, Howe FA, Ziegler A, Majos C, Moreno-Torres A, Rijpkema M, Acosta D, Opstad KS, van der Meulen YM, Arus C, Heerschap A. MRS quality assessment in a multicentre study on MRS-based classification of brain tumours. *NMR Biomed.* 2008; 21:148–158.
30. Mocioiu V, Ortega-Martorell S, Olier I, Jablonski M, Starcukova J, Lisboa P, Arús C, Julià-Sapé M. From raw data to data-analysis for magnetic resonance spectroscopy - the missing link: jMRUI2XML. *BMC Bioinformatics.* 2015;16:378-388.
31. Ortega-Martorell S, Olier I, Julià-Sapé M, Arús C. SpectraClassifier 1.0: a user friendly, automated MRS-based classifier-development system. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:106.
32. eTumour Consortium eTumour: Web accessible MR Decision support system for brain tumour diagnosis and prognosis, incorporating in vivo and ex vivo genomic and metabolomic data. Technical report, FP6-2002-LIFESCIHEALTH 503094, VI framework programme.

33. González-Vélez H, Mier M, Julià-Sapé M, Arvanitis T, García-Gómez J, Robles M, Lewis P, Dasmahapatra S, Dupplaw D, Peet A, Arús C, Celda B, Van Huffel S, Lluch-Ariet M. HealthAgents: distributed multi-agent brain tumor diagnosis and prognosis. *Applied Intelligence*. 2009; 30:191-202.
34. Garcia-Gomez J.M, Luts J, Julia-Sape M, Krooshof P, Tortajada S, Robledo JV, Melssen W, Fuster-Garcia E, Olier I, Postma G, Monleon D, Moreno-Torres A, Pujol J, Candiota AP, Martinez-Bisbal MC, Suykens J, Buydens L, Celda B, Van Huffel S, Arus C, Robles M. Multiproject-multicenter evaluation of automatic brain tumor classification by magnetic resonance spectroscopy. *Magn. Reson. Mat. Phys. Biol. Med.* 2009;22: 5–18.
35. Tate AR, Julià-Sapé M, Ladroue C, Murphy M, Loosemore A, Bell BA, Wilkins P, Capdevila A, Majós C, Moreno A, Howe FA, Arús C, Griffiths JR. Automated Classification of Brain Tumours from 1H MRS Spectra in INTERPRET, a Multi-Centre Collaboration 10th Scientific Meeting and Exhibition, 18-24 May 2002 in Honolulu, Hawaii.
36. Fuster-Garcia E, Navarro C, Vicente J, Tortajada S, García-Gómez J, Sáez C, Calvar J, Griffiths J, Julià-Sapé M, Howe F, Pujol J, Peet A, Heerschap A, Moreno-Torres À, Martínez-Bisbal MC, Martínez-Granados B, Wesseling P, Semmler W, Capellades J, Majós C, Alberich-Bayarri À, Capdevila A, Monleón D, Martí-Bonmatí L, Arús C, Celda B, Robles M. Compatibility between 3T 1 H SV-MRS data and automatic brain tumour diagnosis support systems based on databases of 1.5T 1H SV MRS spectra. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* 2011;24:35–42.
37. Sanderson S, Green A, Preece MA, Burton H. The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. *Arch Dis Child*. 2006;91:896-9.
38. Aygen S, Dürr U, Hegele P, Kunig J, Spraul M, Schäfer H, Krings D, Cannet C, Fang F, Schütz B, Bülbül SF, Aydın HI, Sarıcı SU, Yalaz M, Ors R, Atalan R, Tuncer O. NMR-Based Screening for Inborn Errors of Metabolism: Initial Results from a Study on Turkish Neonates. *JIMD Rep.* 2014;16:101-11.
39. Marszał E. Leukodystrofie oraz inne choroby ośrodkowego układu nerwowego z uszkodzeniem istoty białej u dzieci i młodzieży. *Śl. AM, Katowice* 1998.
40. Patay Z. Metabolic disorders. W: *Pediatric Neuroradiology*. Brain. Red. Tortori-Donati P, Rossi A, Biancheri R, Springer, Berlin-Heidelberg 2005, 234–255.

41. Minister Zdrowia. Program Badań Przesiewowych Noworodków w Polsce na lata 2015-2018. (<http://www.mz.gov.pl/zdrowie-i-profilaktyka/programy-zdrowotne/wykaz-programow/program-bada-przesiewowych-noworodkow-w-polsce-na-lata-2009-2014/>) (dostęp: 20.05.2016 r.)
42. Barkovich AJ. An approach to MRI of metabolic disorders in children. *J Neuroradiol.* 2007;34(2):75-88.
43. van der Voorn JP, Pouwels PJ, Hart AA, Serrarens J, Willemsen MA, Kremer HP, Barkhof F, van der Knaap MS. Childhood white matter disorders: quantitative MR imaging and spectroscopy. *Radiology.* 2006; 241:510–7.
44. Stöckler S, Holzbach U, Hanefeld F, Marquardt I, Helms G, Requart M, Hänicke W, Frahm J. Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatr Res.* 1994;36:409-13.
45. Schulze A. Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem.* 2003;244:143-50.
46. Bizzi A, Bugiani M, Salomons GS, Hunneman DH, Moroni I, Estienne M, Danesi U, Jakobs C, Uziel G. X-linked creatine deficiency syndrome: a novel mutation in creatine transporter gene SLC6A8. *Ann Neurol.* 2002;52:227-31.
47. Wittsack HJ, Kugel H, Roth B, Heindel W. Quantitative measurements with localized ¹H MR spectroscopy in children with Canavan's disease. *J Magn Reson Imaging.* 1996;6: 889–93.
48. Hanefeld FA, Brockmann K, Pouwels PJ, Wilken B, Frahm J, Dechent P. Quantitative proton MRS of Pelizaeus-Merzbacher disease: evidence of dys- and hypomyelination. *Neurology.* 2005;65:701-6.
49. Mandal R, Guo AC, Chaudhary KK, Liu P, Yallou FS, Dong E, Aziat F, Wishart DS. Multi-platform characterization of the human cerebrospinal fluid metabolome: a comprehensive and quantitative update. *Genome Med.* 2012;4:38.
50. Chabrol B, Salvan AM, Confort-Gouny S, Vion-Dury J, Cozzzone PJ. Localized proton magnetic resonance spectroscopy of the brain differentiates the inborn metabolic encephalopathies in children. *C R Acad Sci III.* 1995;318:985-92.
51. Salvan AM, Confort-Gouny S, Chabrol B, Cozzzone PJ, Vion-Dury J. Brain metabolic impairment in non-cerebral and cerebral forms of X-linked adrenoleukodystrophy by proton MRS: identification of metabolic patterns by discriminant analysis. *Magn Reson Med.* 1999;41:1119-26.

52. Bizzi A, Castelli G, Bugiani M, Barker PB, Herskovits EH, Danesi U, Erbetta A, Moroni I, Farina L, Uziel G. Classification of childhood white matter disorders using proton MR spectroscopic imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29:1270-5.
53. Barker PB, Bryan RN, Kumar AJ, Naidu S. Proton NMR spectroscopy of Canavan's disease. *Neuropediatrics.* 1992;23:263-7.
54. Ricci R, Bacci A, Tugnoli V, Battaglia S, Maffei M, Agati R, Leonardi M. Metabolic findings on 3T 1H-MR spectroscopy in peritumoral brain edema. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2007;28:1287-91.
55. <http://www.variation.com/cpa/tech/changepoint.html> (dostęp: 20.05.2016 r.)
56. Ivanisevic J, Siuzdak G. The Role of Metabolomics in Brain Metabolism Research. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015;10:391-5.
57. Baker EH, Basso G, Barker PB, Smith MA, Bonekamp D, Horská A. Regional apparent metabolite concentrations in young adult brain measured by (1)H MR spectroscopy at 3 Tesla. *J Magn Reson Imaging.* 2008;27:489-99.
58. Pouwels PJ, Frahm J. Regional metabolite concentrations in human brain as determined by quantitative localized proton MRS. *Magn Reson Med.* 1998;39:53-60.
59. Minati L, Aquino D, Bruzzone MG, Erbetta A. Quantitation of normal metabolite concentrations in six brain regions by in vivo 1H MR spectroscopy. *J Med Phys.* 2010;35:154-63.
60. Emir UE, Auerbach EJ, Van De Moortele PF, Marjańska M, Uğurbil K, Terpstra M, Tkáč I, Oz G. Regional neurochemical profiles in the human brain measured by 1H MRS at 7 T using local B1 shimming. *NMR Biomed.* 2012; 25:152-60.
61. Vingara LK, Yu HJ, Wagshul ME, Serafin D, Christodoulou C, Pelczer I, Krupp LB, Maletić-Savatić M. Metabolomic approach to human brain spectroscopy identifies associations between clinical features and the frontal lobe metabolome in multiple sclerosis. *Neuroimage.* 2013;82:586-94.
62. Oberg J, Spenger C, Wang FH, Andersson A, Westman E, Skoglund P, Sunnemark D, Norinder U, Klason T, Wahlund LO, Lindberg M. Age related changes in brain metabolites observed by 1H MRS in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging.* 2008;29:1423-33.

63. <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm8/> Dostęp: 20.05.2016r.
64. <http://biu.bangor.ac.uk/projects.php.en> Dostęp 20.05.2016r.
65. Wansapura JP, Holland SK, Dunn RS, Ball WS Jr. NMR relaxation times in the human brain at 3.0 tesla. *J Magn Reson Imaging*. 1999;9:531-8.
66. Wang J, Shaffer ML, Eslinger PJ, Sun X, Weitekamp CW, Patel MM, Dossick D, Gill DJ, Connor JR, Yang QX. Maturational and aging effects on human brain apparent transverse relaxation. *PLoS One*. 2012;7:e31907.
67. Deelchand DK, Adanyeguh IM, Emir UE, Nguyen TM, Valabregue R, Henry PG, Mochel F, Öz G. Two-site reproducibility of cerebellar and brainstem neurochemical profiles with short-echo, single-voxel MRS at 3T. *Magn Reson Med*. 2015;73:1718-25.
68. Piechnik SK, Evans J, Bary LH, Wise RG, Jezzard P. Functional changes in CSF volume estimated using measurement of water T2 relaxation. *Magn Reson Me*. 2009 61:579–586
69. Abbas Z, Gras V, Möllenhoff K, Keil F, Oros-Peusquens AM, Shah NJ. Analysis of proton-density bias corrections based on T1 measurement for robust quantification of water content in the brain at 3 Tesla. *Magn Reson Med*. 2014;72:1735-45.
70. Ethofer T, Mader I, Seeger U, Helms G, Erb M, Grodd W, Ludolph A, Klose U. Comparison of longitudinal metabolite relaxation times in different regions of the human brain at 1.5 and 3 Tesla. *Magn Reson Med*. 2003;50:1296-301.
71. Lin C, Bernstein M, Huston J, Fain S (2001) Measurements of T1 relaxation times at 3.0: implications for clinical MRA. In: *Proceedings of international society for magnetic resonance in medicine*. 2001, 1391.
72. Abbas Z, Gras V, Möllenhoff K, Oros-Peusquens AM, Shah NJ. Quantitative water content mapping at clinically relevant field strengths: a comparative study at 1.5 T and 3 T. *Neuroimage*. 2015;106:404-13.
73. Naressi A, Couturier C, Castang I, de Beer R, Graveron-Demilly D. Java-based graphical user interface for MRUI, a software package for quantitation of in vivo/medical magnetic resonance spectroscopy signals. *Comput Biol Med*. 2001;31:269-86.

74. Wong JW, Cagney G, Cartwright HM. SpecAlign--processing and alignment of mass spectra datasets. *Bioinformatics*. 2005;21:2088-90.
75. Jolliffe IT. *Principal Component Analysis*, 2nd Edn., New York: Springer-Verlag (2002).
76. Wold S, Sjostrom M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemomet Int Lab Syst* 2001; 58: 109-130.
77. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wold S. Multi and megavariate data analysis. *Umetrics*, 2001 (www.umetrics.com).
78. Kreis R, Boesch C. Bad spectra can be better than good spectra. In: Proc 11th Annual Meeting ISMRM, Toronto, 2003.
79. Jaeger C, Glaab E, Michelucci A, Binz TM, Koeglsberger S, Garcia P, Trezzi JP, Ghelfi J, Balling R, Buttini M. The mouse brain metabolome: region-specific signatures and response to excitotoxic neuronal injury. *Am J Pathol*. 2015;185:1699-712.
80. Tsang TM, Griffin JL, Haselden J, Fish C, Holmes E. Metabolic characterization of distinct neuroanatomical regions in rats by magic angle spinning 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med*. 2005;53:1018-24.
81. Irie M, Fujimura Y, Yamato M, Miura D, Wariishi H. Integrated MALDI-MS imaging and LC-MS techniques for visualizing spatiotemporal metabolomic dynamics in a rat stroke model. *Metabolomics*. 2014;10:473-483.
82. Gasparovic C, Bedrick EJ, Mayer AR, Yeo RA, Chen H, Damaraju E, Calhoun VD, Jung RE. Test-retest reliability and reproducibility of short-echo-time spectroscopic imaging of human brain at 3T. *Magn Reson Med*. 2011;66:324-32.
83. McLean MA, Woermann FG, Barker GJ, Duncan JS. Quantitative analysis of short echo time (1)H-MRSI of cerebral gray and white matter. *Magn Reson Med*. 2000;44:401-11.
84. Wiedermann D, Schuff N, Matson GB, Soher BJ, Du AT, Maudsley AA, Weiner MW. Short echo time multislice proton magnetic resonance spectroscopic imaging in human brain: metabolite distributions and reliability. *Magn Reson Imaging*. 2001;19:1073-80.

85. van der Veen JW, Shen J. Regional difference in GABA levels between medial prefrontal and occipital cortices. *J Magn Reson Imaging*. 2013;38:745-50
86. Zhang Y, Shen J. Regional and tissue-specific differences in brain glutamate concentration measured by in vivo single voxel MRS. *J Neurosci Methods*. 2015;239:94-9.
87. Ivanisevic J, Epstein AA, Kurczy ME, Benton PH, Uritboonthai W, Fox HS, Boska MD, Gendelman HE, Siuzdak G. Brain region mapping using global metabolomics. *Chem Biol*. 2014; 21:1575-84.
88. Choi CG, Frahm J. Localized proton MRS of the human hippocampus: metabolite concentrations and relaxation times. *Magn Reson Med*. 1999;41:204-7.
89. Sabati M, Sherif S, Gu M, Wei J, Zhu H, Barker PB, Spielman DM, Alger JR, Maudsley AA. Multivendor implementation and comparison of volumetric whole-brain echo-planar MR spectroscopic imaging. *Magn Reson Med*. 2015;74:1209-20.
90. Keevil SF, Barbiroli B, Brooks JC, Cady EB, Canese R, Carlier P, Collins DJ, Gilligan P, Gobbi G, Hennig J, Kügel H, Leach MO, Metzler D, Mlynárik V, Moser E, Newbold MC, Payne GS, Ring P, Roberts JN, Rowland IJ, Thiel T, Tkáč I, Topp S, Wittsack HJ, Podo F, et al. Absolute metabolite quantification by in vivo NMR spectroscopy: II. A multicentre trial of protocols for in vivo localised proton studies of human brain. *Magn Reson Imaging*. 1998;16:1093-106.
91. Gasparovic C, Song T, Devier D, Bockholt HJ, Caprihan A, Mullins PG, Posse S, Jung RE, Morrison LA. Use of tissue water as a concentration reference for proton spectroscopic imaging. *Magn Reson Med*. 2006;55:1219-26.

