

UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE IULIU HATIEGANU CLUJ-NAPOCA

## REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

---

# EVALUAREA SPECTROSCOPICĂ PRIN REZONANȚĂ MAGNETICĂ A TUMORILOR PELVINE

---

Doctorand **Dávid Réka Emma**

---

Coordonator științific **Prof. Dr. Viorica Magdalena Nagy**

---

CLUJ-NAPOCA 2023



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HATIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CONȚINUT

INTRODUCERE	12
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Modalități imagistice și rolul lor în evaluarea tumorilor pelvine	18
1.1 Ultrasonografie	19
1.2 Tomografie Computerizată	19
1.3 FDG PET	19
2. Rezonanța magnetică în evaluarea tumorilor pelvine	21
2.1 IRM bazele și protocoale	21
2.2 Aspectul IRM în anatomia uterină	22
2.3 Aspectul IRM tumori pelvine	23
3. Spectroscopie prin IRM în evaluarea cancerului pelvin	28
3.1 Bazele spectroscopiei prin IRM	29
3.1.1 Principiile IRM	35
3.1.2 Chemical shift	35
3.1.3 Timpii de relaxare IRM	35
3.2 Metaboliți relevanți în tumori pelvine benigne și maligne	36
4. Relaxometria in vivo IRM în evaluarea țesuturilor normale și patologice	38
CONTRIBUȚII PERSONALE	43
1. Ipoteza de lucru și Obiective	45
2. Metodologia generală	46
2.1. In vivo MRS protocol pentru achiziția de date brute	46
2.2 Protocol de preprocesare a datelor MRS	46
2.3 Protocol de procesare a datelor MRS	47
2.4 Protocol de achiziție a examinărilor pelvine IRM și relaxometria IRM	48
2.5 Grupuri de studiu	48
2.6 Principal Components Analysis, PCA	49
3. Studiul I. Spectroscopia in vivo 1H IRM și harta de relaxometrie a pelvisului feminin	50
3.1 Introducere	51
3.2 Ipoteza de lucru	52
3.3. Materiale și Metode	52
3.4 Rezultate	54
3.5. Discuții	69
3.6. Concluzii	74
4. Studiul II. Spectroscopia in vivo 1H IRM a uterului normal și canceros	75
4.1 Introduction	75
4.2 Ipoteza de lucru	75
4.3 Materiale și Metode	75
4.4 Rezultate	77
4.5 Discuții	80
4.6 Concluzii	82
5. Studiul III. Studiu de fezabilitate a spectroscopiei IRM în evaluarea tumorilor pelvine feminine	83
5.1 Introduction	83
5.2 Ipoteza de lucru	83
5.3 Materiale și Metode	83
5.4 Rezultate	85
5.5 Discuții	87
5.6 Concluzii	88
6. Discuții generale	89
7. Concluzii generale	92
8. Originalitate și contribuții inovative	94

---

**CUVINETE CHEIE:** rezonanță magnetică nucleară, spectroscopie, CT, ultrasonografie, relaxometrie, tumori maligne pelvine, imagistică

## Introducere

Odată cu creșterea rapidă a asistenței medicale de precizie, imagistica va juca un rol important în gestionarea pacienților, diagnostic, monitorizare și prognoza bolilor. Imagistica medicală le permite medicilor să detecteze stadiul actual al bolii și oferă informații valoroase pentru evaluarea clinică.

Imagistica medicală joacă un rol crucial în fluxul de lucru clinic pentru evaluarea pacienților cu tumori pelvine, de la diagnosticul inițial la tratament și urmărire. Imagistica este o procedură standard utilizată zilnic pentru a asigura un management precis și eficace al pacienților.

Tumorile pelvine sunt o formă de malignitate prevalentă la nivel mondial, iar în rândul femeilor, tumorile maligne ginecologice reprezintă o cauză semnificativă a deceselor legate de cancer<sup>i</sup>. Tumorile pelvine reprezintă o provocare complexă în ceea ce privește tratamentul, deoarece sunt adesea detectate tardiv în evoluție, și prezintă semne și simptome nespecifice. Deși metodele de diagnosticare au evoluat semnificativ, detectarea precoce a tumorilor maligne rămâne dificilă și adesea neconcludentă. Biopsia rămâne standardul de aur pentru diagnostic, în ciuda faptului că este o tehnică invazivă, cu rezultate adesea neconcludente.

Imagistica este extrem de importantă în diagnosticarea, stadializarea și planificarea tratamentului masei pelvine, în special în patologia uterină. Modalități de imagistică, cum ar fi ultrasunetele, tomografia computerizată (CT), imagistica prin rezonanță magnetică (RMN) și tomografia cu emisie de pozitroni (PET/PET-CT) sunt utilizate în mod cotidian pentru a obține informații relevante pentru gestionarea bolii<sup>ii</sup>. Ecografia este principala metodă utilizată pentru caracterizarea și stratificarea tumorilor pelvine. În patologia pelviană feminină, ecografia prezintă o acuratețe diagnostică ridicată, dar în cazurile complexe, aceasta poate avea limitări. CT și PET-CT sunt utilizate în mod obișnuit pentru stadializarea tumorilor maligne. În timp ce ecografia și CT sunt instrumente valoroase pentru evaluarea patologiei pelvine și sunt disponibile pe scară largă, acestea pot fi lipsite de specificitate. Această limitare poate fi depășită prin suplimentarea ecografiei și a CT cu IRM.

Examinarea prin RMN oferă informații valoroase, înainte de tratament, despre masele pelvine și amploarea lor. Este o tehnică de imagistică extrem de specifică și precisă ce poate identifica originea anatomică a leziunilor maligne, oferă informații privind unele caracteristici tisulare și, adesea, conduce la un diagnostic definitiv<sup>iii</sup>. IRM este o tehnică neinvazivă ce oferă acuratețe diagnostică crescută la stadializarea și evaluarea ganglionilor limfatici. Este totodată un instrument fiabil pentru monitorizarea răspunsului la tratament și supravegherea post-tratament<sup>iv</sup>.

Examinarea prin RMN oferă informații valoroase, înainte de tratament, despre masele pelvine și amploarea lor. Este o tehnică de imagistică extrem de specifică și precisă ce poate identifica originea anatomică a leziunilor maligne, oferă informații privind unele caracteristici tisulare și, adesea, conduce la un diagnostic definitiv<sup>v</sup>. IRM este o tehnică neinvazivă ce oferă acuratețe diagnostică crescută la stadializarea și evaluarea ganglionilor limfatici. Este totodată un instrument fiabil pentru monitorizarea răspunsului la tratament și supravegherea post-tratament<sup>vi</sup>.

În ultimul deceniu s-au înregistrat progrese semnificative în domeniul imagisticii avansate, multe tehnici fiind deja folosite în practica clinică. Deși examinarea prin RMN s-a dovedit a fi utilă în multe stadii clinice prin mai multe studii, ea are limitări în detectarea bolii în stadiu incipient<sup>vii</sup>. Inovările încurajatoare în domeniul tehnicilor avansate de IRM aduc evaluarea neinvazivă mai aproape de diagnosticul precoce al tumorilor maligne, însă multe dintre aceste tehnici sunt încă în faza de studiu și sunt costisitoare. În plus, accesibilitatea RMN este limitată în multe regiuni, fiind limitată, în majoritatea instituțiilor, la indicații clinice specifice pentru anumiți grupuri de pacienți. Aceste provocări au dus la căutarea unor metode RMN mai rapide și mai rentabile pentru detectarea cancerului în stadiu incipient, a recidivei după tratament și pentru monitorizarea răspunsului la tratament. O soluție potențială este integrarea secvențelor IRM avansate



în examinările standard, creând un "ghișeu unic" pentru detectarea transformărilor maligne, inclusiv până la nivel metabolic, într-o singură ședință.

Spectroscopia RMN cu protoni este o tehnică RMN *in vivo* neinvazivă ce oferă informații despre metabolismul biochimic. În anumite cazuri, aceasta poate diferenția între masele maligne și benigne *in vivo*. Cu toate acestea, din cauza limitărilor tehnice, este o metodă de lungă durată și nespecifică<sup>viii</sup>. Contribuția sa în detectarea precoce a tumorilor maligne, în stadializarea tumorilor și în planificarea și monitorizarea tratamentului este limitată. În radioterapie, rolul important al spectroscopiei prin rezonanță magnetică (SRM) a fost clar stabilit în cadrul gestionării tumorilor cerebrale și prostatice. Spectroscopia RM este capabilă să diferențieze necroza de radiație de recidiva tumorală. După prostatectomia radicală, IRM cu SRM suplimentară este sensibilă la detectarea recidivei tumorale în patul prostatic și în țesutul înconjurător.<sup>9</sup> Nu a fost realizat niciun studiu amplu de evaluare a rolului SRM în radioterapia tumorilor maligne pelvine feminine.

Elaborarea unei metode specifice de SRM, cuantificabile, ar putea facilita o cartografiere mai precisă a modificărilor metabolice în masele pelvine maligne. În această lucrare ne-am concentrat pe dezvoltarea unei metode de înaltă precizie ce să permită cuantificarea fiabilă și exactă a compoziției metaboliților în tumorile pelvine.

O altă tehnică RMN neinvazivă *in vivo* este cartografierea relaxometrică. Relaxometria cantitativă a fost utilizată, în principal, în studiile de cercetare a creierului, inimii, ficatului și sânelui. Datele obținute relevă rezultate promițătoare la analiza țesuturilor și a malignității<sup>ix</sup>. După cum s-a demonstrat în diverse studii de caz, relaxometria cantitativă permite un diagnostic mai specific pentru o largă gamă de boli, inclusiv a celor maligne. Relaxometria trece dincolo de analiza anatomică în IRM și permite identificarea fiziopatologiei de fond și a caracteristicilor tisulare.

## Ipoteză de lucru și obiective

Scopul prezentei teze este de a elabora un software special de postprocesare a datelor, bazat pe spectroscopia de rezonanță magnetică și relaxometrie IRM, pentru evaluarea tumorilor pelvine benigne și maligne.

Prin utilizarea examenului SRM ne-am propus să identificăm metaboliții cei mai comuni implicați în căile fiziopatologice, și să detectăm transformarea malignă în faza precoce a bolii; să cuantificăm metaboliții specifici ce permit distincția între tumorile benigne și maligne. Prin crearea unui software specific de postprocesare a datelor generate prin SRM am dorit să punem bazele unei cuantificări mai precise a compoziției metaboliților în țesuturile examinate prin IRM.

Prin elaborarea unui al doilea software specific de postprocesare a relaxometriei pentru analiza parametrilor  $T_1$ ,  $T_2$  și  $^1H$  de densitate de spin în regiunea bazinului am urmărit să măsurăm timpii de relaxare specifici ai țesuturilor benigne și maligne, și să creăm hărți de cuantificare pentru determinarea extinderii tumorii.

Inițial, activitatea noastră s-a concentrat asupra celor mai comune tumori maligne feminine, anumele cele pelvine. Am dezvoltat un protocol detaliat și specific de postprocesare a datelor legate de patologii normale, benigne și maligne. Această teză și-a atins obiectivul inițial, iar, pe viitor, intenționăm să extindem această metodă și asupra altor tumori pelvine maligne, precum cancerul rectal, cancerul de prostată și adenopatia pelviană.

Dezvoltarea noastră originală pentru postprocesarea datelor obținute prin SRM și relaxometrie va permite o analiză imagistică mai fiabilă, din momentul diagnosticului inițial și până la tratamentul pacientului și gestionarea bolii. În plus, va facilita detectarea precoce a recidivei.

Scopul primului studiu este de a modifica și de a utiliza protocoale clinice standard bazate pe spectroscopia prin RM  $^1H$ , precum și imagini RMN din secțiuni T1w, T2w ponderate, pentru a evalua concentrația celor mai comuni metaboliți macromoleculari și timpii de relaxare transversală specifici miometrului uterin  $T_2^*$ , cât și pentru a evalua hărțile parametrilor de densitate spin  $^1H$  spin-densitate din regiunea pelviană, pentru un lot de femei voluntare, sănătoase.

Scopul celui de-al doilea studiu a fost de a crea un instrument de evaluare complex și specific, bazat pe examinarea SRM  $^1H$ , pe analiza noastră software specifică de postprocesare, și pe analiza componentelor statistice principale (ACP) cu obiectivul de a diferenția între pacientele normale și cele cu cancer endometrial, incluzând zece parametri diverși ca set de date. Această procesare specifică a datelor ne permite să grupăm țesuturile normale, benigne și maligne.

Obiectivele celui de-al treilea studiu au fost: de a măsura și cuantifica compoziția metaboliților diferitelor categorii histologice de tumori pelvine cu ajutorul instrumentelor de postprocesare create, și de a analiza fiabilitatea software-ului în diferențierea țesuturilor maligne de cele benigne.

## Metodologie generală

Toate examinările RMN au fost efectuate cu un scanner 3T (General Electric 750w Discovery®, GE Medical Systems, Milwaukee WI, SUA). Comisia de etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" din Cluj-Napoca a aprobat toate studiile prospective efectuate în cadrul prezentei teze. Consimțământul informat în scris a fost obținut de la paciente înainte de screeningul RMN. Baza de date rezultată a cuprins secvențe pelvine RMN fără contrast realizate înainte de tratament, alături de secvențe speciale obținute prin SRM și relaxometrie prin rezonanță magnetică. Pacientelor li s-a solicitat să postească timp de cel puțin 6 ore înainte de examinare.



S-a administrat un antispastic intravenos cu cel puțin zece minute înainte de examinare, pentru a reduce artefactele de mișcare cauzate de peristaltismul intestinal sau eventuale contracții uterine. Populația studiată a fost selectată utilizând criteriile de selecție și excludere descrise separat, pentru fiecare studiu în parte.

### **Protocol de achiziție de date in vivo din SRM**

Toți voluntarii au fost examinați cu o unitate RMN 3T (Discovery MR750w, GE) folosind o bobină corporală și un receptor *phased-array* cu 16 canale, utilizat în mod standard pentru examinarea regiunii bazinului. Achiziția datelor SRM a durat aproximativ 4-7 minute/secvență.

SRM a fost efectuată utilizând secvența de spectroscopie rezolvată punctual (PRESS) cu un singur volum de interes spectroscopic pătrat (VOI) plasat în interiorul corpului uterin, pentru a include stratul endometrial.

Dimensiunea voxelului a fost cuprinsă între 3,6 - 18,4 ml. Benzile de suprimare a volumului exterior au fost plasate manual, la șase margini ale VOI, în secțiuni axiale, sagitale și coronare. În toate cazurile a fost utilizată metoda automată de șamponare.

Au fost achiziționate două secvențe diferite la TE diferiți: i) timp de repetiție (TR)/timp de ecou (TE) 1500/35 ms; dimensiunea matricei 1x1, numărul de excitații (NEX): 8, numărul total de scanări: 128 și ii) TR/TE, 1500/144 ms, cu dimensiune a matricei, NEX și număr total de scanări identice.

### **Protocol de postprocesare a datelor SRM**

Spectrele RM  $^1\text{H}$  înregistrate ca date brute pe aparatul GE 3T Discovery MR750w (împreună cu capturile de ecran salvate din regiunea investigată, regiunea de interes (ROI) cu voxel și benzi de saturație, precum și imagini spectroscopice utilizate ca în multe alte rapoarte) au fost importate în software-ul jMRUI versiunea 6.0-beta. Software-ul jMRUI 6.0 este capabil să recunoască versiunea General Electric Discovery MR750w, și să separe fiecare canal de date (fază).

Am utilizat opțiunea de combinare și adăugare pentru a separa semnalul de apă de semnalul de metabolit și de semnalul rezidual. Aici trebuie să subliniem că s-a evidențiat existat un puternic semnal asociat cu apa în semnalul de metaboliti. Semnalul de timp  $^1\text{H}$  are 4.096 de puncte, care sunt crescute prin procedura de umplere zero, aplicată pentru o mai bună rezoluție a spectrelor Fourier Transformate, la 16.384 (214) puncte. Toate imaginile RM înregistrate pentru acest studiu cu TE = 35 ms au fost apodizate utilizând o formă de linie Lorentziană cu factor Lorentzian de 2 Hz, în timp ce pentru imaginile RM înregistrate cu TE = 144 ms factorul a fost de 4 Hz. În acest fel am crescut raportul semnal-zgomot și am evitat posibilul efect oscilator de tip sinc indus în spectre prin timpul de degradare incomplet al semnalului.

Semnalul de apă (pură), care inițial este centrat pe zero, este apoi utilizat pentru a stabili referința (în ppm) pentru toate spectrele.

## Protocol de procesare date SRM

Pentru a cuantifica conținutul de metaboliți din fiecare spectru, am scris un program complex de ajustare în Processing™, care este un software bazat pe Java inițiat de Ben Fry și Casey Reas și dezvoltat de multe persoane, care poate combina cu ușurință elementele vizuale (necesare pentru utilizatorul final, cum ar fi radiologul cu mai puțină experiență în programare) cu manipularea datelor.

Programul nostru personalizat se bazează pe anumite elemente: 1) am creat o bază de date cu cei mai comuni 42 de metaboliți și 10 macromolecule (M1 - M10) . Am folosit informațiile rezumate despre deplasarea chimică și cuplarea J în principal din cartea lui de Graaf și referințele din aceasta 77, 78 2) datele de intrare au fost fișierul text salvat din jMRUI după analiza preliminară; 3) variabilele au fost tipul și numărul de metaboliți, amplitudinea și lățimea liniei pentru fiecare spectru de metabolit; 4) modelul de analiză spectrală se bazează pe modelul popular LC (combinație liniară a spectrelor de metaboliți); 5) algoritmul de potrivire se bazează pe metoda populară neliniară a celor mai mici pătrate Levenberg-Marquardt , care este implementată în multe software-uri de programare și statistică; 6) datele de ieșire de interes sunt amplitudinea și lățimile de linie optimizate pentru fiecare spectru de metabolit, conținutul relativ al fiecărui metabolit în spectrele de intrare (aici, spectrele de metabolit așa cum rezultă din datele preprocesate de jMRUI), timpul efectiv de relaxare transversală și spectrul de potrivire ca sumă a tuturor spectrelor de metabolit. Metoda Levenberg-Marquardt este una dintre numeroasele metode utilizate pentru a ajusta datele. De exemplu, problema descompunerii semnalului RMN multicomponent care se suprapune a fost discutată de Shao și Sun, dar pentru spectre mai rezolvate decât cele obținute în cazul nostru Pentru o caracterizare extinsă a spectrelor de metaboliți la valori mai mari de 4 ppm, fiecare structură de metabolit a fost creată și optimizată în Gaussian 09 și/sau ChemBio3D Ultra. Structura a fost importată în gNMR și un spectru corespunzător a fost simulat pentru o frecvență Larmor de 127,77 MHz (sau un câmp magnetic de 3,0009 T corespunzător unității noastre Discovery MR750w, GE). Parametrii de deplasare chimică finală și cuplarea J au fost aleși ca fiind cei mai buni din cartea de Graaf92 (în special pentru valori mici până la semnalul apei) și cei rezultați din programul de simulare gNMR (în special pentru valori mai mari de 4 ppm).

## Protocol IRM pentru examinarea bazinului și relaxometria IRM

Toți voluntarii au fost investigați pe o unitate RMN 3T (GE Discovery MR750w), folosind o bobină corporală și un receptor cu 16 canale phased-array, standard pentru investigațiile pelvisului. Durata medie de scanare a fost de 50 de minute. În plus față de imaginile T2w și T1w, protocolul complet a început cu o secvență de localizare și s-a încheiat cu o secvență de imagistică ponderată prin difuzie. Pacienții au fost rugați să postească timp de cel puțin 6 ore înainte de examinare. S-a administrat un antispastic cu cel puțin zece minute înainte de examinare, pentru a reduce artefactele de mișcare datorate peristaltismului intestinal sau contracțiilor uterine.

Protocolul de achiziție pentru  $T_2^*$ ,  $T_1^*$  și hărțile parametrilor de densitate de spin  $^1\text{H}$  ale regiunii pelvine

Au fost obținute două hărți de achiziție pentru cu TE diferit pe eco de spin rapid T2W axial FRFSE-XL (TR/TE), 5000/30 ms, respectiv 5000/200), lungimea trenului de eco (ETL) de 19-26, grosimea secțiunii (ST) 4 mm; decalajul de intersecție, 0,8 mm; câmpul de vizualizare (FOV), 350-400 mm; dimensiunea matricei 384x256, NEX2.

S-au obținut două achiziții pentru harta cu TR diferit pe eco de spin rapid axial T1W FSE-XL (TR/TE, 7000/20 ms, respectiv 400/20 ms, ETL de 3-4), ST, 4 mm; intersection gap, 0,8 mm; FOV 350-400 mm; dimensiunea matricei 384x224, NEX 2.



## Grupuri de studiu

Pentru primul studiu am folosit datele unei serii de 11 femei voluntare sănătoase de vârstă reproductivă sau în perimenopauză, cu vârste cuprinse între 24 și 47 de ani (media 35,5). La momentul investigației, faza lor menstruală nu a fost înregistrată cu precizie. Pentru a declara o voluntară ca fiind sănătoasă, aceasta a fost supusă unui examen ginecologic, inclusiv o ecografie pelvină și un test Papanicolau. Examinarea RM pelvină a fost supravegheată și evaluată de un radiolog experimentat.

În cel de-al doilea grup de studiu am inclus cinci subiecți sănătoși și 5 femei cu cancer endometrial. Examenul ginecologic, ce a inclus ecografie și frotiu Papanicolau, a fost efectuat înainte de SRM. Toate cazurile cu cancer endometrial au avut confirmare histologică.

Studiul a fost aprobat de comisia de etică a Universității de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca și s-a obținut consimțământul informat al tuturor participantelor.

În cel de-al treilea studiu am inclus 28 de femei cu tumori pelvine. Toate cazurile au fost verificate histologic. Pacientele înrolate au fost diagnosticate cu tehom (2 cazuri), miom uterin (4 cazuri), chist dermoid (3 cazuri), chist endometrial (4 cazuri), adenomioză (2 cazuri), cistadenom (4 cazuri), cistadenocarcinom (2 cazuri), carcinom ovarian endometrioid (3 cazuri) și carcinom uterin endometrial (4 cazuri).

## PCA

PCA este o analiză statistică multivariată, o metodă standard utilizată pentru analiza datelor caracterizate de numeroase variabile sau a tipuri de variabile obținute, de obicei, din mai multe grupuri<sup>x</sup>. Pentru analiza noastră PCA a conținutului de metaboliți măsurat din spectrele RMN <sup>1</sup>H *in vivo* am implementat un program numeric scris în Processing<sup>TM</sup> și am reprezentat grafic rezultatul cu ajutorul Microsoft Excel.

## Discuție generală

Spectroscopia RMN cu protoni este un instrument neinvaziv ce poate studia sistemele biologice atât *in vivo*, cât și *in vitro*, și poate detecta numeroși metaboliți tisulari. Analiza metaboliților măsurati, observabili prin RMN, poate furniza informații chimice valoroase despre căile fiziologice și fiziopatologice *in vivo*. SRM cu protoni poate adăuga informații substanțiale la examinarea clinică, iar utilizarea sa a crescut în ultimul deceniu, parțial datorită tehnologiilor îmbunătățite și a disponibilității sporite<sup>xi</sup>. Cu toate acestea, utilizarea SRM în practica clinică ridică mai multe provocări.

În pofida disponibilității tot mai mari și a tehnologiilor îmbunătățite, SRM necesită în continuare echipamente specializate și expertiză, ceea ce limitează utilizarea sa pe scară largă. În plus, interpretarea datelor SRM poate fi complexă și necesită o pregătire și cunoștințe adecvate<sup>101</sup>. În plus, reproductibilitatea măsurătorilor SRM poate fi afectată de factori precum mișcarea și poziționarea pacientului, neomogenitatea câmpului magnetic și variabilitatea regiunii de interes selectate.

În ciuda acestor provocări, numeroase studii au demonstrat importanța IRM și a SRM în evaluarea primară înainte de tratament, în urmărirea răspunsului la tratament și în detectarea precoce a recidivei în cazul tumorilor pelvine. Datele metabolice obținute prin SRM sunt de valoare adăugată pentru diferențierea între tumorile benigne și cele maligne. SRM poate confirma sau exclude o potențială malignitate în majoritatea tumorilor pelvine. Utilizarea combinată a IRM cu SRM îmbunătățește considerabil acuratețea diagnosticului și oferă o mai bună caracterizare imagistică a maselor nedeterminate. Prin evaluarea caracteristicilor metabolice ale țesuturilor, SRM poate trece dincolo de limitele anatomice și poate



îmbunătăți managementul pacienților<sup>109</sup>. De asemenea, SRM evalua calitativ și semicantitativ concentrația de metaboliți în tumorile anexiale și uterine, și poate oferi informații valoroase pentru planificarea pretratamentului.

Din cauza diversității tehnicilor SRM și a echipamentelor utilizate pentru a colecta date specifice, nu s-a ajuns încă la un consens în ceea ce privește utilizarea clinică a spectroscopiei IRM sau standardizarea procesului.

Propunem un nou protocol inovator de postprocesare pentru datele SRM colectate cu ajutorul IRM, ce este reproductibil și poate fi gestionat zilnic în mediul clinic. Studiile noastre sunt în concordanță cu literatura de specialitate actuală. Cu ajutorul instrumentului specific de postprocesare, am reușit să identificăm metaboliți specifici țesuturilor maligne și am reușit, în plus, să cuantificăm concentrațiile de metaboliți la nivel tisular.

În primul nostru studiu am analizat compoziția metaboliților la femei sănătoase aflate de vârstă reproductivă sau în perimenopauză, cu vârste cuprinse între 24 și 47 de ani (media 35,5). Am considerat acest lucru deosebit de important, deoarece voxelul de interes nu este flexibil și, în majoritatea cazurilor, există o contaminare a țesutului de interes cu țesut uterin normal din jur. Obiectivul nostru a fost să analizăm compoziția normală a metaboliților din țesutul uterin.

Studiile anterioare privind metaboliții specifici zonei uterine raportează în principal prezența colinei (colină totală), creatinei, lipidelor, lactaților și în puține cazuri a compușilor N-acetil-mucoși.<sup>80,84</sup>

Spectrele noastre <sup>1</sup>H RMN măsurate *in vivo* la 3T, pentru endometrul normal al unui grup de femei sănătoase, prezintă un raport semnal-zgomot mult mai bun, ceea ce ne-a permis să cuantificăm mai bine metaboliții.

Acest studiu își propune să fie o referință pentru studii ulterioare. Componentele principale din semnalul metabolitului sunt ale apei, lipidelor, IMCL și macromoleculelor, în special M1 și M2. Am detectat, de asemenea, un conținut ridicat de NAA. Picul de colină apare în toate spectrele măsurate la femeile sănătoase. Conținutul mediu de lactat este aproape jumătate din conținutul de colină, în timp ce creatina a fost găsită într-un procent foarte scăzut.

Am reușit să identificăm cei patru cei mai comuni patru metaboliți raportați anterior în diverse studii bazate pe RM ale uterului malign, în special ale endometrului. În acest sens, am găsit niveluri relativ ridicate de colină și lipide (IMCL) și niveluri scăzute de creatină și lactat. În plus, am identificat mulți alți metaboliți, cei mai notabili fiind NAA și rezonanțele macromoleculare M1 și M2.

În cel de-al doilea studiu am evaluat relaxometria T<sub>2</sub> și T<sub>1</sub>, utilizată cu succes în patologia cerebrală și în evaluarea patologiei cartilajului genunchiului. Timpul de relaxare normal al uterului și al anexelor a fost evaluat doar în puține studii. Cu toate acestea, valoarea adăugată a cartografierii prin relaxometrie T<sub>2</sub> a straturilor uterine s-a dovedit a fi semnificativă în evaluarea invadării miometrului în carcinomul endometrial.<sup>4</sup>

Studiile au demonstrat fiabilitatea relaxometriei  $T_2$  în practica clinică, prin evidențierea extensiei tumorii și detectarea posibilei adenopatii limfactice. Relaxometriile  $T_2$  și  $T_1$  sunt specifice structurii și compoziției tisulare, și sunt determinate de caracteristicile biofizice intrinseci. Relaxometria a oferit o cale nouă în cuantificarea țesutului canceros și a întinderii acestuia.<sup>xii,xiii</sup>

Metoda noastră de cuantificare a timpilor de relaxare este în consens cu literatura de specialitate, demonstrând specificitatea crescută a imagisticii țesuturilor sănătoase.

O limitare a studiului este numărul mic de pacienți și voluntari incluși. Faza menstruală nu a fost înregistrată.

Sunt necesare investigații și studii suplimentare pe o populație mai mare pentru a evalua influența ciclului menstrual asupra modificărilor metabolice și a timpilor de relaxare  $T_2/T_1$ .

Efectuarea de măsurători cantitative prin relaxometria IRM a unor țesuturi specifice necesită achiziția de imagini multiple și alinierea exactă a acestora. Nerespectarea unei colectări riguroase a datelor poate duce la interpretări eronate.

Scopul celui de-al doilea studiu a fost de a crea un protocol de evaluare complex bazat pe SRM  $^1H$ , analiza post-procesare și PCA statistic pentru a diferenția cu precizie între endometrul normal și cel canceros, folosind zece parametri diferiți. Prin utilizarea PCA am reușit să grupăm și să stratificăm pacientele și să diferențiem, cu unele suprapuneri, între pacientele normale de cele maligne. Luând în considerare nu numai separarea datelor, ci și tendința de grupare, putem conchide că lista de metaboliți introdusă aici este bine aleasă pentru a descrie voluntarii sănătoși. Pentru a descrie particularitățile cancerului endometrial trebuie să extindem lista pentru a obține elementul cheie caracteristic.

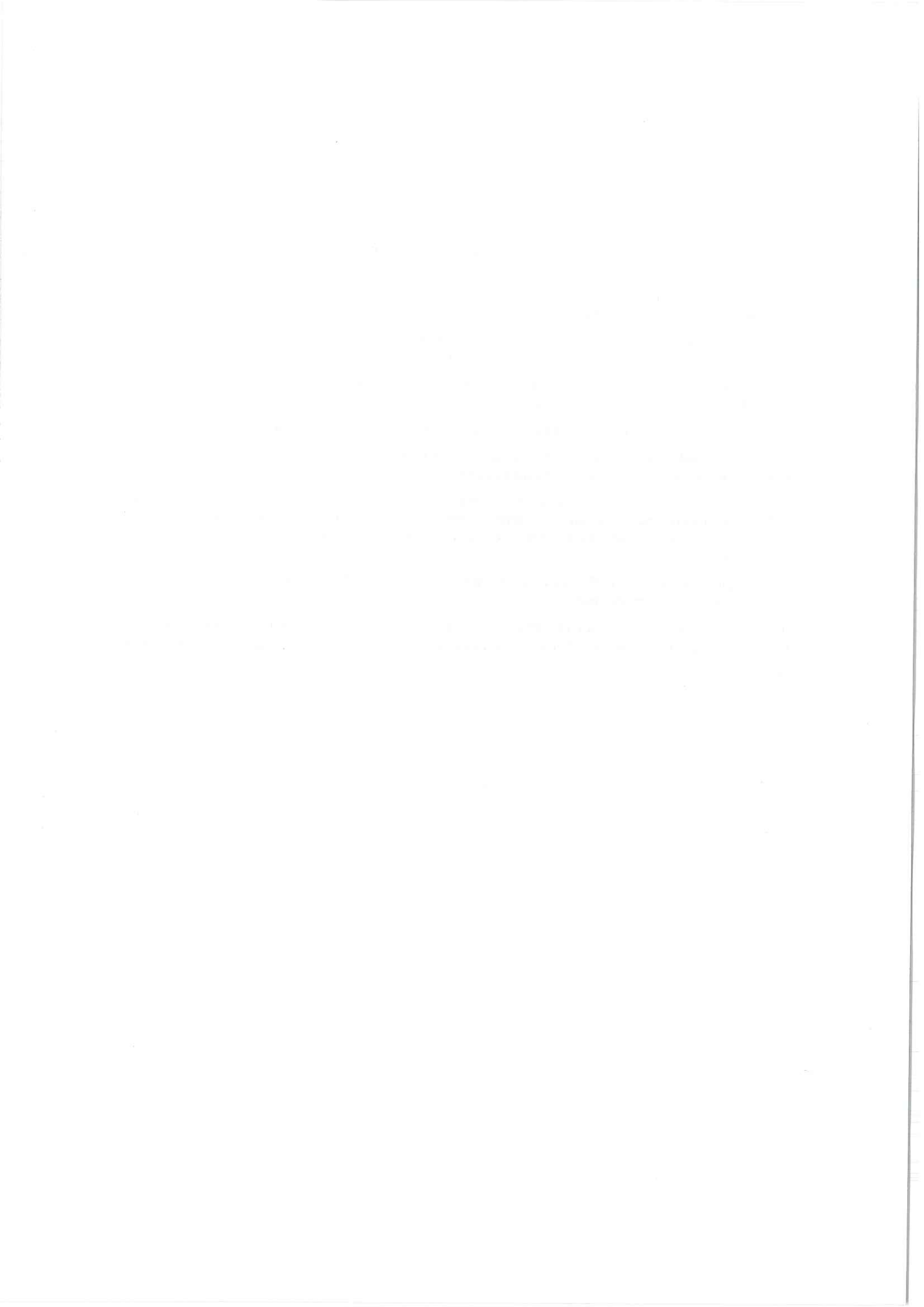
Scopul acestui studiu este de a valida software-ul dezvoltat care permite analiza semnalelor MRS pe baza segmentării spectrelor. Am încercat să analizăm MRS de protoni a tumorilor feminine intrapelvine cu ajutorul unui aparat RMN clinic (3T) și să evaluăm modelele MRS ale diferitelor tipuri histologice de tumori. Am reușit să identificăm cei mai importanți metaboliți găsiți în tumorile pelvine feminine, așa cum sunt menționați în literatura de specialitate. Am constatat că lipidele și colina prezintă un vârf mai mare în patologiile maligne. Vârful colinei se regăsește, de asemenea, în tumorile benigne, cum ar fi tehomul, miomul sau chistul dermoid, această suprapunere a profilului metabolic cu cel al tumorilor maligne îngreunează diagnosticul.

Nivelurile de creatină au fost în general mai scăzute decât cele de colină. Am găsit un vârf de lactat ridicat în adenomioză și în carcinomul endometrial uterin, principala diferență fiind că carcinomul endometrial uterin a prezentat un vârf de lactat mai ridicat. Constatările noastre sunt în concordanță cu rezultatele găsite în literatura de specialitate și am reușit să cuantificăm în continuare datele metabolice pe care le-am obținut.



## Concluzii generale

1. Spectroscopia de RMN 1H permite evaluarea cantitativă a concentrațiilor de metaboliți atât în tumorile pelvine, cât și în țesuturile sănătoase.
  2. Spectroscopia RMN cu protoni poate diferenția în mod eficace tumorile maligne de cele benigne, permițând stratificarea pacienților.
  3. Studiul nostru a identificat cei mai relevanți metaboliți menționați anterior în studiile privind cancerul uterin și anexial, cât și alți metaboliți specifici ce pot avea un rol potențial în țesuturile maligne.
  4. Prin efectuarea unei analize informatice speciale pe baza examinării spectroscopiei RMN de protoni, am reușit să realizăm stratificarea pacienților.
  5. Am demonstrat fezabilitatea creării hărților de relaxometrie RMN ale țesuturilor sănătoase.
  6. Analiza cantitativă a relaxometriei IRM și a spectroscopiei RM cu protoni oferă posibilitatea de a măsura proprietățile biofizice, fiziologice și fiziopatologice ale țesuturilor examinate.
  7. Cuantificarea concentrațiilor de metaboliți în anumite țesuturi cu ajutorul spectroscopiei RMN 1H poate ajuta la planificarea tratamentului, la evaluarea răspunsului la tratament și la identificarea precoce a recidivei. E nevoie de studii suplimentare pentru a stabili criteriile optime de diagnostic și valoarea diagnostică.
  8. Adăugarea relaxometriei IRM și a spectroscopiei RMN 1H îmbunătățește precizia diagnosticului tehnicilor imagistice convenționale.
  9. Cu ajutorul acestei proceduri inovatoare, am reușit să identificăm semnături metabolice specifice țesutului și organului, ce ar putea fi utilizate pentru a stabili marker biologici fiziologici și fiziopatologici specifici.
-





# SUMMARY OF PHD THESIS

---

## **Nuclear magnetic resonance spectroscopy evaluation of pelvic malignant tumors**

---

PhD Student **DávidRéka Emma**

---

PhD Scientific Coordinator **Prof. Dr. Viorica Magdalena Nagy**

---

CLUJ-NAPOCA 2023



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	<b>12</b>
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	<b>17</b>
<b>1. Imaging modalities and their roles in pelvic tumors</b>	<b>18</b>
1.1 Ultrasound	19
1.2 Computed tomography	19
1.3 FDG PET	19
<b>2. Magnetic resonance imaging in pelvic tumors</b>	<b>21</b>
2.1 MRI basics and protocols	21
2.2 MRI anatomy of the uterus	22
2.3 MRI appearance in tumors	23
<b>3. NMR spectroscopy assessment of pelvic cancer</b>	<b>28</b>
3.1 Basic NMR spectroscopy	29
3.1.1 NMR principles	35
3.1.2 Chemical shift	35
3.1.3 NMR relaxation times	35
3.2 Relevant metabolites for benign and cancerous female pelvic tumors	36
<b>4. In vivo NMR relaxometry assessment of healthy and pathological tissues</b>	<b>38</b>
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	<b>43</b>
<b>1. Working hypothesis and objectives</b>	<b>45</b>
<b>2. General methodology</b>	<b>46</b>
2.1. In vivo MRS protocol for data acquisition	46
2.2 MRS data pre-processing protocol	46
2.3 MRS data processing protocol	47
2.4 MRI protocol for pelvic examination and MRI relaxometry	48
2.5 Study groups	48
2.6 Principal Components Analysis, PCA	49
<b>3. Study I. In vivo <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and relaxometry maps of the human female pelvis</b>	<b>50</b>
3.1 Introduction	51
3.2 Working hypothesis	52
3.3. Materials and Methods	52
3.4 Results	54
3.5. Discussion	69
<b>4. Study II. In vivo <sup>1</sup>H MRS of the normal and cancerous human female uterus</b>	<b>75</b>
4.1 Introduction	75
4.2 Working hypothesis	75
4.3. Material and Method	75
4.4 Results	77
4.5 Discussion	80
4.6 Conclusions	82
<b>5. Study III. Feasibility of Proton MR Spectroscopy in the evaluation of human female pelvic tumors</b>	<b>83</b>
5.1 Introduction	83
5.2 Working hypothesis	83
5.3 Material and Method	83
5.4 Results	85
5.5 Discussion	87
5.6 Conclusions	88
<b>6. General discussion</b>	<b>89</b>
<b>7. General conclusions</b>	<b>92</b>
<b>8. Originality and innovative contribution</b>	<b>94</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>97</b>

**Keywords:** magnetic resonance spectroscopy, CT, ultrasound, relaxometry, pelvic malignant tumors.



## Introduction

With the rapid growth of precision healthcare, imaging will play an important role in patient management, diagnosis, monitoring, and disease prognosis. Medical imaging enables physicians to detect the disease state and provides valuable information for clinical assessment.

Medical imaging plays a crucial role in the clinical workflow for patients with pelvic tumors, from initial diagnosis to treatment and follow-up. Imaging is a standard procedure used daily to ensure accurate and effective patient management.

Pelvic tumors are a prevalent form of malignancy worldwide, and among women, gynecological malignancies are a significant cause of cancer-related deaths. Pelvic tumors present a complex treatment challenge, as they are often detected late in their course and exhibit nonspecific signs and symptoms. While diagnostic methods have evolved significantly, early detection of malignancies remains difficult and frequently inconclusive. Biopsy remains the gold standard for diagnosis, despite being an invasive technique with often inconclusive results.

Imaging is of utmost importance in the diagnosis, staging and treatment planning of pelvic masses, especially in uterine pathology. A variety of imaging modalities such as ultrasound, computed-tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography (PET/PET-CT) are used on a daily basis to obtain relevant information for disease management<sup>i</sup>. Ultrasound is the primary method used for characterizing and stratifying pelvic tumors. In female pelvic pathology, ultrasound shows high diagnostic accuracy, but in complex cases, it may have limitations. CT and PET-CT are commonly used for staging malignant tumors. While ultrasound and CT are valuable tools for evaluating pelvic pathology and widely available, they may lack specificity. This limitation can be overcome by supplementing ultrasound and CT with MRI.

MRI examination provides valuable pre-treatment information about pelvic masses and their extent. It is a highly specific and accurate imaging technique that can identify the anatomic origin of malignant lesions, provide tissue characteristics, and often lead to a definitive diagnosis<sup>ii</sup>. MRI is a non-invasive technique that provides high diagnostic accuracy for staging and lymph node assessment. It is also a reliable tool for monitoring treatment response and post-treatment surveillance<sup>iii</sup>.

In the last decade, significant progress has been made in the field of advanced imaging, with many techniques already being applied in clinical practice. Although MRI examination has been proven to be useful in many clinical stages by several studies, it has limitations in detecting early-stage disease<sup>iv</sup>. Encouraging innovations in advanced MRI techniques bring non-invasive assessment closer to early diagnosis of malignancies, but many of these techniques are still in the study phase and are expensive. Furthermore, MRI accessibility is limited in many areas, and in most institutions, it is restricted to specific clinical questions for selected patients. These challenges have led to the search for quicker and more cost-effective MRI methods for detecting early-stage cancer, relapse after treatment, and monitoring treatment response. A potential solution is the integration of advanced MRI sequences into standard examinations, creating a 'one-stop shop' for detecting malignant transformation in one session, even at a metabolic level.

Proton MRI spectroscopy is a non-invasive in vivo MRI technique that provides information on biochemical metabolism. In certain cases, it can differentiate between malignant and benign masses in vivo. However, due to technical limitations, it is a lengthy and non-specific method<sup>v</sup>. Its contribution in

early detection of malignancies, tumor staging and treatment planning and monitoring is restricted. In radiotherapy the important role of magnetic resonance spectroscopy (MRS) has been clearly established in management of brain and prostatic tumors. MR spectroscopy is able to differentiate radiation necrosis from tumor recurrence. After radical prostatectomy, MRI with additional MRS is sensitive to detecting tumor recurrence in the prostate bed and surrounding tissue.<sup>9</sup> No extensive study has been made in evaluating the role of MRS in radiotherapy of female pelvic malignancy.

Elaborating a specific quantifiable MRS method could facilitate a more accurate mapping of metabolic alterations in malignant pelvic masses. In this paper, we focused on developing a highly precise method to enable reliable and exact quantification of metabolite composition in pelvic tumors.

Another non-invasive in vivo MRI technique is relaxometry mapping. Quantitative relaxometry has mostly been used in research studies of the brain, heart, liver, and breast. The obtained data show promising results in tissue and malignancy analysis<sup>vi</sup>. As demonstrated in various case studies, quantitative relaxometry enables a more specific diagnosis of a wide range of diseases, including malignancies. Relaxometry extends beyond anatomical analysis in MRI and enables mapping of the underlying pathophysiology and tissue characteristics.<sup>vii</sup>

### **Working hypothesis and objectives**

The purpose of the present thesis is to elaborate a special data post-processing software based on magnetic resonance spectroscopy and relaxometry for the evaluation of benign and malignant pelvic tumors.

By using MRS examination, we aimed to establish the most common metabolites involved in the pathophysiological pathways and detect malignant transformation in early phase of the disease, to quantify specific metabolites distinguishing between benign and malignant tumors. By building a specific data post-processing software for MRS, we wanted to set the grounds for a more precise quantification of metabolite composition in tissues examined by MRI.

By elaborating a second specific post-processing relaxometry software in analyzing T1, T2 and 1H spin-density parameter maps of the pelvic area, we aimed to measure the specific relaxation times of benign and malignant tissues and to create quantification maps to determine tumor extent.

Initially, our work focused on female pelvic malignancies, which are the most common. We developed a detailed and specific protocol for post-processing data related to normal, benign, and malignant pathologies. This thesis has achieved its initial goal, and in the future, we plan to expand this method to other pelvic malignancies, such as rectal cancer, prostate cancer, and pelvic adenopathy.

Our original development of data post-processing using MRS and relaxometry will enable more reliable imaging analysis from the initial diagnosis to patient treatment and disease management. Furthermore, it will facilitate early detection of relapse.

The aim of the first study is to modify and use standard clinical protocols based on 1H MR spectroscopy and T1w, T2w weighted MRI images in order to assess the most common macromolecular metabolites concentration and the corresponding transverse relaxation times  $T_2^*$  specific to the uterine myometrium and to evaluate  $T_2^*$ ,  $T_1^*$  and <sup>1</sup>H spin-density parameter maps of the pelvic region for a lot of healthy female volunteers.



The goal of the second study was to create a complex and specific evaluation instrument based on  $^1\text{H}$  MRS examination, our specific post-processing software analysis and principal statistical component analysis (PCA) to differentiate between normal and endometrial cancer patients, including ten diverse parameters as a data set. This specific data processing allows us to cluster normal, benign and malignant tissues.

The objectives of the third study were to use the created post-processing tools to measure and quantify metabolite composition of different histological types of pelvic tumors and to analyze the feasibility of the software in differentiating malignant from benign tissues.

### **General methodology**

All MRI examinations were performed with a 3T scanner (General Electric 750w Discovery®, GE Medical Systems, Milwaukee WI, USA). The Ethics Committee of "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca approved all prospective studies conducted in this thesis. Written informed consent was obtained from patients before the MRI screening. The resulting database contained non-contrast-enhanced MRI pre-therapy pelvic sequences, along with special sequences obtained by MRS and magnetic resonance relaxometry. Patients were asked to fast for at least 6 hours prior to the examination.

An antispasmodic drug was administered intravenously at least ten minutes before the examination to reduce movement artifacts caused by bowel movement or uterine contractions. The studied population was selected using inclusion and exclusion criteria as described in each study.

### **In vivo MRS protocol for data acquisition**

All volunteers were investigated on a 3T MRI unit (Discovery MR750w, GE) using a body coil and a 16-channel phased-array receiver, standard for pelvis investigations. MRS data acquisition took about 4-7 minutes/sequence.

MRS was performed using point resolved spectroscopy sequence (PRESS) with single square spectroscopic volume-of-interest (VOI) placed within the uterine corpus to include the endometrial layer.

The voxel size was between 3.6 – 18.4 ml. Outer-volume suppression bands were manually placed at six edges of the VOI in axial, sagittal and coronal sections. In all cases automated shimming method was used.

Two different sequences were acquired at different TE: i) repetition time (TR)/ echo time (TE), 1500/35 ms; matrix size 1x1, number of excitations (NEX), 8, total number of scans 128 and ii) TR/TE, 1500/144 ms, with the same matrix size, NEX and total number of scans.

### **MRS data preprocessing protocol**

The  $^1\text{H}$  MR spectra recorded as raw data on the 3T Discovery MR750w, GE unit (together with screen saved images of investigated area, region of interest (ROI) with voxel and saturation bands and spectroscopic images, used as it is in many other reports) was imported in jMRUI Version 6.0-beta software. The 6.0 jMRUI software is capable to recognize the Discovery MR750w, General Electric version and to separate each data (phase) channel.



We used the combine and add option to separate water signal from metabolite signal and from residual signal. Here we have to underline that there was a large signal associated with water in the metabolite signal. The  $^1\text{H}$  time signal has 4,096 points, which are increased by zero filling procedure, applied for a better resolution of Fourier Transformed spectra, to 16,384 ( $2^{14}$ ) points. All MR spectra recorded for this study with TE = 35 ms were apodized using a Lorentzian line shape with a 2 Hz Lorentzian factor, while for the MR spectra recorded with TE = 144 ms the factor was 4 Hz. In this way we increased the signal-to-noise ratio and avoid the possible sinc-like oscillatory effect induced in spectra by incomplete decay time of the signal.

The (pure) water signal, which initially is centered on zero, is then used to set the reference (in ppm) for all spectra.

### **MRS data processing protocol**

In order to quantify the metabolite content in each spectrum we wrote a complex fitting program in Processing<sup>TM</sup>, which is a Java based software started by Ben Fry and Casey Reas and greatly developed by many people, which can easily combine visual elements (necessary for the end user, like the radiologist with less experience in programming) with data manipulation.

Our custom-made program is based on certain elements: 1) we created a database of most common 42 metabolites and 10 macromolecules (M1 - M10)<sup>viiiix</sup>. We used the summarized information about chemical shift and J-coupling mainly from de Graaf book and references therein<sup>77,78</sup> 2) the input data was the text file saved from jMRUI after preliminary analysis; 3) the variables were: type and number of metabolites, amplitude and linewidth for each metabolite spectrum; 4) the model of spectral analysis is based on the popular LC model (linear combination of metabolite spectra); 5) the fitting algorithm is based on the popular non-linear least square Levenberg–Marquardt method<sup>x</sup>, which is implemented in many programming and statistical software; 6) the output data of interest are the optimized amplitude and linewidths for each metabolite spectra, the relative content of each metabolite in the input spectra (here, the metabolite spectra as resulted from jMRUI pre-processed data), the effective transverse relaxation time  $T_2^*$  and the fitting spectrum as a sum of all metabolite spectra. The Levenberg–Marquardt method is one of the many methods use to fit the data. For example, the decomposition of multicomponent overlapping NMR signal problem was discussed by Shao and Sun but for more resolved spectra that those obtained in our case<sup>x</sup>For an extended characterization of metabolite spectra at values larger than 4 ppm, each metabolite structure was created and optimized in Gaussian 09 and/or ChemBio3D Ultra. The structure was imported in gNMR and a corresponding spectrum was simulated for a Larmor frequency of 127.77 MHz (or 3.0009 T magnetic field corresponding to our Discovery MR750w, GE unit). The final chemical shift ( $\delta$ ) parameters and J coupling were chosen as the best from de Graaf book<sup>92</sup> (especially for small  $\delta$  values up to water signal) and those resulted from gNMR simulation program (especially for  $\delta$  values larger than 4 ppm).

### **MRI protocol for pelvic examination and MRI relaxometry**

All volunteers were investigated on a 3T MRI unit (Discovery MR750w, GE), using a body coil and a 16-channel phased-array receiver, standard for pelvis investigations. The average scanning time was 50 minutes. Additional to T2w and T1w images the full protocol started with a localization sequence and ended with a diffusion-weighted imaging sequence. Patients were asked to fast for at least 6 hours prior to examination. An antispasmodic drug was administrated intravenously at least ten minutes before the examination in order to reduce movement artifacts due to bowel movement or uterine contractions.

Acquisition protocol for  $T_2^*$ ,  $T_1^*$  and  $^1\text{H}$  spin-density parameter maps of the pelvic region:

Two acquisitions maps were obtained for  $T_2^*$  with different TE on axial T2W fast spin echo FRFSE-XL (TR/TE), 5000/30 ms, respectively 5000/200), echo train length (ETL) of 19-26, section thickness (ST) 4 mm; intersection gap, 0,8 mm; field of view (FOV), 350-400 mm; matrix size 384x256, NEX2.

Two acquisitions were obtained for the  $T_2^*$  map with different TR on axial T1W fast spin echo FSE-XL (TR/TE, 7000/20 ms, respectively 400/20 ms, ETL of 3-4), ST, 4 mm; intersection gap, 0,8 mm; FOV 350-400 mm; matrix size 384x224, NEX 2.

### Study groups

For the first study we used the data for a series of 11 healthy human female volunteers in reproductive or perimenopausal period with ages between 24 and 47 years (mean 35.5). At the time of investigation their menstrual phase was not accurately recorded. In order to declare a volunteer as healthy they underwent gynecological examination, including pelvic ultrasound and a Papanicolaou test. Pelvic MR examination was supervised and evaluated by an experimented radiologist.

We included 5 healthy subjects and 5 females with endometrial cancer in the second study group. Gynecological examination, which included ultrasound and Papanicolu smear, was performed prior to MRS. All cases with endometrial cancer had histological confirmation.

The study was approved by the ethics committee of Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca and informed consent was obtained from all participants.

In the third study we included 28 females with pelvic tumors. All cases were histologically verified. Patients enrolled were diagnosed with thecoma (2 cases), uterine myoma (4 cases), dermoid cyst (3 cases), endometrial cyst (4 cases), adenomyosis (2 cases), cystadenoma (4 cases), cystadenocarcinoma (2 cases), ovarian endometrioid carcinoma (3 cases), and uterine endometrial carcinoma (4 cases).

### PCA

PCA is a multivariate statistical analysis, a standard method used to analyze data characterized by numerous variables or types of variables usually obtained from more than one group<sup>xii</sup>. For our PCA analysis of metabolite content measured from in vivo  $^1\text{H}$  NMR spectra, we implemented a numerical program written in Processing and we plotted the result using Microsoft Excel.6. General discussion

### General discussion

Proton NMR spectroscopy is a non-invasive tool that can study biological systems both in vivo and in vitro, and it can detect numerous tissue metabolites. Analysis of the measured NMR-observable metabolites can provide valuable chemical information about physiological and pathophysiological pathways in vivo.

Proton MRS can add substantial information to clinical examination, and its use has increased in the last decade partly due to improved technologies and increased availability.<sup>xiii</sup>

However, the application of MRS in clinical practice poses several challenges.



Despite the increasing availability and improved technologies, MRS still requires specialized equipment and expertise, limiting its widespread use. In addition, the interpretation of MRS data can be complex and requires proper training and knowledge<sup>101</sup>. Furthermore, the reproducibility of MRS measurements can be affected by factors such as patient motion and positioning, magnetic field inhomogeneity, and variability in the selection of the region of interest.

Despite these challenges, numerous studies have demonstrated the importance of MRI and MRS in primary pretreatment evaluation, treatment response follow-up, and early detection of relapse in pelvic tumors. Metabolic data obtained by MRS has added valuable information for differentiating between benign and malignant tumors. MRS can confirm or exclude potential malignancy in most pelvic tumors. The combined use of MRI with MRS greatly improves diagnostic accuracy and provides better imaging characterization of indeterminate masses. By assessing metabolic characteristics of tissues, MRS can go beyond anatomical limits and improve patient management<sup>109</sup>. MRS can also qualitatively and semi-quantitatively evaluate metabolite concentration in adnexal and uterine tumors, and provide valuable information for pretreatment planning.

Due to the diversity of MRS techniques and equipment used to collect specific data, no consensus has been reached regarding the clinical use of MRI spectroscopy or standardization of the process.

We propose a new innovative post-processing protocol for MRS data collected with MRI that is reproducible and can be managed on a daily clinical basis. Our studies are consistent with the up-to-date literature. With the specific post-processing tool, we were able to identify specific metabolites of malignant tissues, and we were further able to quantify metabolite concentrations at the tissue level.

In our first study, we analyzed metabolite composition in healthy women in the reproductive period or perimenopause, aged between 24 and 47 years (mean 35.5). We found this particularly important because the voxel of interest is not flexible, and in most cases, there is contamination of the tissue of interest with normal surrounding uterine tissue. Our aim was to analyze the normal metabolite composition of the uterine tissue.

Previous studies on the metabolites specific to uterine area mainly report the presence of Choline (total Choline), Creatine, Lipids, Lactate and in few cases the N-acetyl mucous compounds.<sup>80 84</sup>

Our <sup>1</sup>H NMR spectra measured in vivo at 3T for the normal endometrium of a group of healthy women present a much better signal-to-noise ratio that allowed us to better quantify the metabolites.

This study aims to be a reference base for further studies. The main component from the metabolite signal is water, lipids, IMCL and macromolecules, especially M1 and M2. We also detected a high content of NAA. The choline peak appears in all spectra measured in healthy women. The lactate average content is almost half the choline content, while creatine was found in a very low percentage.

We were able to identify the four most common metabolites previously reported in various MR-based studies of the malignant uterus, particularly the endometrium. In this regard, we found relatively high levels of choline and lipids (IMCL) and low levels of creatine and lactate. Additionally, we identified many other metabolites, the most noticeable being NAA and M1 and M2 macromolecular resonances.

In the second study we evaluated T<sub>2</sub> and T<sub>1</sub> relaxometry used with success in brain pathology and in assessing knee cartilage pathology. The normal relaxation time of the uterus and adnexa has only been evaluated in few studies. However, the added value of T<sub>2</sub> relaxometry mapping of uterine layers proved significant in evaluating endometrial carcinoma invasion of the myometrium.<sup>4</sup>



Studies have demonstrated the feasibility of T2 relaxometry in clinical practice by highlighting tumor extent and detecting possible lymph node involvement. T2 and T1 relaxometry are specific to tissue structure and composition and they are determined by intrinsic biophysical characteristics. Relaxometry has offered a novel path in quantifying cancerous tissue and its extent<sup>xiv,xv</sup>.

Our method of quantifying relaxation times is in consensus with the literature, showing the increased imaging specificity of healthy tissues.

One limitation of the study is the small number of patients and volunteers included. The menstrual phase was not recorded.

Further investigation and studies are needed on a larger population to evaluate the influence of the menstrual cycle on metabolic changes and T2/T1 relaxation times.

Performing quantitative measurements of MRI relaxometry of specific tissues requires the acquisition of multiple images and their exact alignment. Failure of following rigorous data collection can lead to misinterpretation.

The aim of the second study was to create a complex evaluation protocol based on <sup>1</sup>H MRS, post-processing analysis and statistical PCA to accurately differentiate between normal and cancerous endometrium, using ten diverse parameters. By using PCA we were able to group and stratify females and to differentiate, with some overlapping, between normal from malignant patients. Taking into account not only data separation but also the grouping tendency we can conclude that the list of metabolites introduced here is well chosen in order to describe healthy volunteers. To describe the particularities of endometrial cancer we have to extend the list to get the characteristic key element.

The aim of this study is to validate the developed software that allows the analysis of the MRS signals based on spectra segmentation. We attempted to analyze proton MRS of intrapelvic female tumors by using clinical MRI gear (3T) and to assess MRS patterns of different histological tumor types. We were able to identify the most important metabolites found in female pelvic tumors, as mentioned in the literature. We found that lipids and choline show a higher peak in malignant pathologies. Cho peak is also found in benign tumors such as thecoma, myoma or dermoid cyst, this overlap of metabolic profile with that of malignant tumors makes diagnosis difficult.

Creatine levels were lower than choline overall. We found a high lactate peak in adenomyosis and uterine endometrial carcinoma, the main difference was that uterine endometrial carcinoma showed a higher lactate peak. Our findings are in conjunction with the results able to quantify the metabolic data we obtained.

### **General conclusions**

1. Proton MR Spectroscopy allows for the quantitative evaluation of metabolite concentrations in both pelvic tumors and healthy tissues.
2. Proton MR Spectroscopy can effectively differentiate between malignant and benign tumors, allowing for patient stratification.
3. Our study identified the most relevant metabolites previously mentioned in studies on uterine and adnexal cancers, as well as additional specific metabolites that may have a potential role in malignant tissues.

4. By performing special PC analysis based on proton MR spectroscopy examination, we were able to achieve patient stratification.
  5. We demonstrated the feasibility of creating MRI relaxometry maps of healthy tissues.
  6. The quantitative assessment of MRI relaxometry and Proton MR Spectroscopy offers the opportunity to measure biophysical, physiological, and pathophysiological properties of examined tissues.
  7. Quantifying metabolite concentrations in specific tissues with Proton MR Spectroscopy can aid in pretreatment planning, evaluating treatment response, and identifying early relapse. Further studies are necessary to establish optimal diagnostic criteria and diagnostic value.
  8. The addition of MRI relaxometry and Proton MR Spectroscopy improves the diagnostic accuracy of conventional imaging techniques.
  9. Using this innovative procedure, we were able to identify tissue and organ specific metabolic signatures that could be used to establish specific physiological and pathophysiological biomarkers.
-