

ارزیابی تغییرات ساختاری پلاکهای MS و ماده سفید ظاهراً نرمال با استفاده

از تصویربرداری کمی انتقال مغناطش (MTI)

معصومه فولادی^۱، نادر ریاحی عالم^{۲*}، محمدحسین حریرچیان^۳، کاووس فیروزنیا^۴، محمدعلی عقابیان^۵، مجید شکیبا^۶، بهروز رفیعی^۷، مرتضی بختیاری^۸

۱- کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دانشیار گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- دانشیار گروه نورولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات مغز و اعصاب بیمارستان امام خمینی، تهران

۴- دانشیار گروه رادیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تصویربرداری بیمارستان امام خمینی، تهران

۵- دانشیار گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۶- پژوهشگر، واحد تحقیقات مرکز تصویربرداری بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۷- کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، مرکز تصویربرداری بیمارستان امام خمینی تهران

۸- کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، واحد تحقیقات مرکز تصویربرداری بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۸۷/۲/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۲

چکیده

مقدمه: مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری تخریب کننده ساختار میلین در سیستم اعصاب مرکزی (CNS) است که عمدتاً افراد جوان با میانگین سنی ۳۰ سال را تحت تأثیر قرار می دهد. تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI) یکی از خاص ترین و حساس ترین روشهای تصویربرداری جهت تشخیص و نمایش میزان تحول و گسترش بیماری مالتیپل اسکلروزیس است. ولی تصویربرداری MR از توانایی لازم، جهت افتراق بین دگرگونی های هیستوپاتولوژیک مشخصی که در آسیب های MS و بافت مغز رخ می دهد، برخوردار نیست. تصویربرداری کمی انتقال مغناطش (qMTI) یک روش نسبتاً جدید تصویربرداری MR جهت بررسی فرایندهای پاتولوژیک بافت مغز است که در بیماران MS رخ می دهد. این تکنیک کمی MRI، قادر است اطلاعات کاملتری در مورد میزان و ماهیت آسیب وارد شده به بافت مغز در بیماری MS ارائه دهد که با تصویربرداری معمول MR قابل آشکار شدن نیست.

مواد و روشها: در این مطالعه، ۱۲ بیمار مبتلا به MS از نوع عودکننده و بهبودیابنده و ۱۲ داوطلب سالم با روشهای تصویربرداری MR بالینی شامل: T1-SE، T2-FSE، FLAIR و همچنین تصویربرداری کمی انتقال مغناطش مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی آسیب های متمرکز مشخص شده روی تصاویر وزنی T2، بر اساس میزان کاهش شدت سیگنالشان روی تصاویر وزنی T1، دسته بندی شدند. ماده سفید مغز و آسیب های MS به کمک یک سیستم نیمه اتوماتیک، بخش بندی شد. آنالیز هیستوگرام نسبت انتقال مغناطش (MTR) برای ماده سفید مغز انجام گرفت و مقدار میانگین MTR برای آسیب های دسته بندی شده MS نیز محاسبه شد.

نتایج: کاهش معنی دار مقدار MTR در ماده سفید ظاهراً نرمال بیماران MS از نوع عودکننده و بهبودیابنده، نشان می دهد که MS بیشتر یک بیماری منتشر شونده است که کل بافت مغز را درگیر می کند. تغییرات گسترده مقادیر MTR را می توان در آسیب های MS مشاهده نمود. کاهش پارامتر MTR با میزان کاهش شدت سیگنال آسیب روی تصاویر وزنی T1 در ارتباط است. مقادیر کمتر MTR آسیب هایی که با شدت سیگنال بسیار کم در تصاویر وزنی T1 ظاهر می شوند، منعکس کننده میزان دمیلیناسیون و تخریب ساختار ماکرومولکولی آسیب های MS می باشد. همچنین تفاوت معنی داری در پارامترهای هیستوگرام MTR بین گروه های کنترل و بیمار وجود داشت که با جابجایی هیستوگرام MTR ماده سفید ظاهراً نرمال به سوی چپ همراه بود.

بحث: نتایج نشان می دهد که MS یک ماهیت منتشر شونده دارد و ناهنجاری های رخ داده در ماده سفید، جدای از ضایعات متمرکز مشاهده شده در تصویر وزنی T2، کل بافت مغز را تحت تأثیر قرار می دهد. از تصویربرداری کمی انتقال مغناطش می توان به عنوان یک روش معتبر جهت ارزیابی میزان گسترش بیماری و ماهیت ذاتی هر یک از آسیب ها در بیماران MS استفاده نمود. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۴، شماره ۱۶ و ۱۷، پاییز و زمستان ۸۶: ۶۴-۵۳)

واژگان کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، تصویربرداری کمی انتقال مغناطش، نسبت انتقال مغناطش، آسیب، ماده سفید مغز

* نویسنده مسؤول: نادر ریاحی عالم

آدرس: گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی تهران riahinad@sina.tums.ac.ir

تلفن: ۸۸۹۷۳۶۵۳-۹۸ (۲۱) + دورنگار: ۸۸۹۷۳۶۵۳-۹۸ (۲۱) +

۱- مقدمه

بیماری مالتیپل اسکلروزیس^۱، MS، از شایع‌ترین عوامل تخریب‌کننده میلین در سیستم اعصاب مرکزی است که در ابتدا با التهاب کانونی و متعدد^۲ بافت مغز و از میان رفتن غلاف میلین پوشاننده آکسونها مشخص می‌شود و عمدتاً بالغین جوان با میانگین سنی ۳۰ سال را مبتلا می‌کند. تخریب بافت سفید مغز همراه با تشکیل ضایعاتی موسوم به پلاک است که در مراحل مختلف فرایند دمیالیناسیون^۳ قرار دارند و به تدریج، بخش‌های متفاوتی از سیستم اعصاب مرکزی را گرفتار می‌کنند. پلاک‌های MS می‌توانند در مغز، نخاع و عصب بینایی قرار گیرند که باعث می‌شود بیماران با علائم نورولوژیک متفاوتی به پزشک مراجعه کنند. ارتباط کمی بین تعداد و اندازه پلاک‌ها با نشانه‌های بالینی بیماری وجود دارد. طوری که ممکن است پلاک‌های وسیع و متعدد در بیمار با نشانه‌های اندکی همراه باشند و یا بالعکس. برخی از بیماران که در طول زندگی خود به شدت ناتوان می‌شوند، یافته‌های پاتولوژیک اندکی داشته‌اند. از آنجا که تشخیص بالینی MS مشکل است، تصویربرداری MRI تبدیل به یکی از مهم‌ترین آزمون‌ها جهت تشخیص آن شده است و به طور گسترده‌ای در تعیین مراحل پیشرفت این بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲و۱].

هر چند که MRI کلینیکی یک تکنیک تصویربرداری بسیار حساس جهت آشکار کردن ناهنجاری‌های ظاهر شده در ماده سفید^۴ مغز می‌باشد، با این حال از ویژگی^۵ کمی در تشخیص دقیق مراحل دمیالیناسیون برخوردار است. از طرفی تصویربرداری معمول MRI شامل تصاویر وزنی T1 و T2، بینش کمی در ارتباط با وضعیت ماده سفید ظاهراً نرمال بیماران MS در اختیار می‌گذارد، طوری که تنها ارتباط ضعیفی بین حجم آسیب دیده شده روی تصاویر وزنی T2 و

ناتوانی بالینی در بیماران MS وجود دارد. این موارد منجر شده که دیگر تکنیک‌های مرتبط با تصویربرداری MRI دنبال شود که قادر باشند اطلاعات پاتولوژیک خاص‌تری را ارائه دهند [۳].

تصویربرداری انتقال مغناطش^۶، MTI، نخستین بار در سال ۱۹۸۹ توسط ولف^۷ و بالابان^۸ به عنوان یک روش کلینیکی که علاوه بر پارامترهای T1، T2 و T2* قادر به تشخیص و ایجاد کنتراست در یک تصویر MR است، معرفی گردید و گسترش داده شد [۴]. در پدیده انتقال مغناطش، برهمکنش بین ائتلاف‌های پروتونی^۹ از اهمیت خاصی برخوردار است. در سیستم‌های بیولوژیکی، فرض بر این است که هسته‌های هیدروژن یا همان پروتونها (H₁) در دو ائتلاف وجود دارند: ائتلاف آزاد^{۱۰} که شامل پروتونهای متحرک در توده آب آزاد و بعضی از بافت‌های شامل چربی می‌شود. این ائتلاف یک خط طیف باریک (۱۰ تا ۱۰۰ هرتز) و زمان آسایش عرضی نسبتاً طولانی (T2 > ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌ثانیه) دارد و در روشهای معمول MRI از بیشترین سهم سیگنال نیز برخوردار است. دومین ائتلاف یا همان ائتلاف محصور شده^{۱۱} شامل پروتونهای محصور شده‌ای می‌شود که به ماکرومولکولهایی مانند پروتئینها، چربیها و غشاهای سلولی متصل شده‌اند. این ائتلاف یک خط طیف بسیار پهن (۱۰ تا ۵۰ کیلو هرتز) و یک زمان آسایش عرضی بسیار کوتاه (۱/۰ میلی‌ثانیه < T2) دارد شکل (۱). هر دو ائتلاف، تقریباً یک فرکانس مرکزی دارند و تنها تفاوت آنها پهنای بیشتر در فرکانس تشدید پروتونهای محصور شده می‌باشد [۵].

6- Magnetization Transfer Imaging

7- Wolff

8- Balaban

9- Proton Pools

10- Free Pool

11- Restricted Pool

1- Multiple Sclerosis

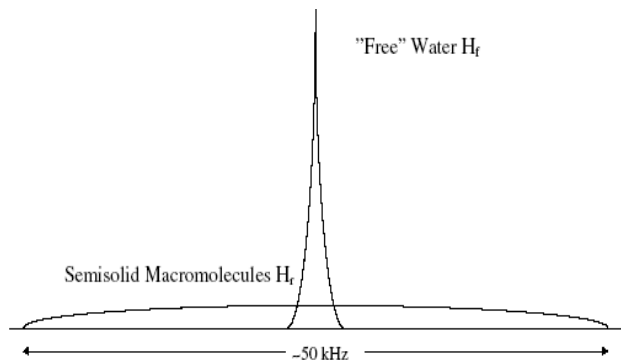
2- Multifocal

3- Demyelination

4- White Matter

5- Specificity

اسپینهای ماکرومولکولی، آنها را 10^6 برابر حساس تر در مقابل یک تابش پالسی خارج از تشدید^۲ پروتونهای آب آزاد می-کند. هنگامی که یک پالس RF با دامنه BISAT به مدت زمان چند ثانیه با فاصله از فرکانس تشدید آب آزاد اعمال گردد، مغناطش پروتونهای باند شده به ماکرومولکولها، اشباع می-شود. این اشباع انتخابی^۳ اسپینهای ماکرومولکولی می تواند به اسپینهای مایع منتقل شود که این خود بستگی به نرخ تبادل میان دو جمعیت اسپینی دارد. تحت تأثیر فرایندهای انتقال مغناطش و اشباع بین پروتونهای ماکرومولکولی و پروتونهای آب، کاهشی در پیک آب آزاد، پس از اشباع طیف نسبتاً پهن فرکانس تشدید پروتونهای باند شده، مشاهده می شود [۹]. در شرایط کلینیکی عمدتاً MTI به همراه تزریق ماده کنتراست-زای گادولینیوم استفاده می شود تا کنتراست بین بافت های enhancing و nonenhancing را ارتقاء بخشد یا این که به همراه MR آنژیوگرافی زمان پرواز^۴ استفاده می شود تا کنتراست بین خون و دیگر بافتها را افزایش دهد. از آنجا که پدیده انتقال مغناطش برای کاهش سیگنال بافتهای با انتقال مغناطش بالا مورد استفاده قرار میگیرد، می تواند وضوح بافتهای با انتقال مغناطش پایین (مانند پلاک های MS و خون در MR آنژیوگرافی) را بهتر کند [۱۰]. در این کاربردهای کلینیکی، MTI برای افزایش کنتراست در تصاویر MRI استفاده می شود که در واقع برای آنالیزهای کیفی طراحی می-گردد. جدای از این موارد، اخیراً اثبات شده که به کارگیری MTI به عنوان یک تکنیک کمی برای تشخیص هر چه بهتر ویژگی بافت مغز، می تواند بسیار مفید باشد. تصویربرداری کمی انتقال مغناطش^۵، qMTI، این امکان را فراهم می کند تا تا ویژگی های پروتونهای باند شده به ماکرومولکولها بهتر



شکل ۱- یک طیف شماتیک گونه از بافت بیولوژیک: خطوط تشدید ائتلاف پروتونهای متحرک H_f (پیک باریک) و پروتونهای با تحرک محدود H_f (پیک پهن). این دو ائتلاف پروتونی به واسطه آسایش مقطعی و تبادل شیمیایی با یکدیگر برهمکنش می کنند.

MRI تنها سیگنال حاصل از پروتونهای متحرک را آشکار می کند که زمان آسایش T2 به قدر کافی طولانی دارند. بنابراین گرادیان های رمزگذاری فضایی می توانند بین پالس تحریک و اکتساب سیگنال، پیش از واپاشی کامل سیگنال اعمال شوند. از طرفی زمان آسایش T2 پروتونهای مرتبط با ماکرومولکولها و غشاها در بافت های بیولوژیکی بسیار کوتاه بوده، به گونه ای که نمی توانند مستقیماً در MRI آشکار شوند. تئوری انتقال مغناطش بر مبنای تبادل مغناطش پروتون، بین آب و مؤلفه های غیر آب می باشد [۶-۸]. جفت شدن دوقطبی-دوقطبی بین پروتونهای ماکرومولکولی و پروتونهای آزاد یا مایع منجر به این میشود که وضعیت اسپینی پروتونهای ماکرومولکولی روی وضعیت اسپینی پروتونهای مایع از طریق فرایندهای تبادل اثر بگذارد. فرایند انتقال مغناطش بین پروتونهای ماکرومولکولی و پروتونهای آب در بافت، بیشتر به واسطه آسایش مقطعی^۱ به وقوع می پیوندد. در بعضی موارد نیز اثر انتقال مغناطش به واسطه تبادل شیمیایی بین ماکرومولکولها و لایه سطحی آب که در ارتباط نزدیک با ائتلاف آب آزاد است، رخ می دهد. پهن تر بودن خط طیف

2- Off Resonance
3- Selective Saturation
4- Time of Flight MR Angiography
5- Quantitative Magnetization Transfer Imaging

1- Cross Relaxation

ضایعات میکروسکوپی را که در تصویربرداری MRI کلینیکی دیده نمی‌شوند، آشکار کند [۱۲-۱۴]. در این مطالعه، با استفاده از تصویربرداری انتقال مغناطش و بخش‌بندی^۳ تصاویر کلینیکال، آنالیز پارامتر نسبت انتقال مغناطش، MTR، در گروه‌های کنترل و بیمار به دو صورت، یکی روش حجمی، شامل ارزیابی تغییرات کلی پارامتر MTR، همچنین رسم هیستوگرام آن و مقایسه پارامترهای مرتبط با هیستوگرام MTR در بافت سفید مغز، بین گروه‌های کنترل و بیمار و دیگری اندازه‌گیری ناحیه‌ای MTR در موقعیت مکانی پلاک MS صورت گرفت. همچنین به منظور ارزیابی دقیقتر تغییرات ساختاری پلاک‌های MS، دسته‌بندی آنها براساس میزان کاهش شدت سیگنال پلاک نسبت به شدت سیگنال ماده سفید مغز، روی تصاویر وزنی T1 انجام شد.

۲- مواد و روشها

دوازده بیمار مبتلا به MS قطعی (۴ مرد و ۸ زن) از نوع عودکننده و بهبودیابنده معرفی شده از بخش تحقیقات بیماریهای مغز و اعصاب بیمارستان امام خمینی و همچنین دوازده داوطلب سالم (۳ مرد و ۹ زن)، فاقد هر گونه سابقه ابتلا به بیماریهای سیستم عصبی در این تحقیق شرکت کردند. میانگین سنی بیماران ۳۱ سال (محدوده سنی ۲۲-۴۵ سال) و متوسط طول دوره بیماری آنها ۴/۸ سال بود و معیارهای تعریف شده را برای قرار گرفتن بیماری در مرحله عودکننده و بهبودیابنده در زمان تصویربرداری برآورده می‌کردند [۱۵]. تعدادی از این بیماران در زمان تحقیق تحت پالس تراپی در بخش داخلی مغز و اعصاب بیمارستان امام خمینی قرار داشتند. میانگین سنی افراد کنترل شرکت کننده نیز ۲۹/۵ سال

مورد بررسی قرار گیرد. این پروتونها از لحاظ کلینیکی مهمتر از پروتونهای آب آزاد می‌باشند و در ماده سفید مغز نیز عمدتاً در میلین قرار گرفته‌اند. جابجایی بین پروتونهای آزاد و ماکرومولکولی می‌تواند هم با ادم^۱ و هم با دیگر تغییرات ساختاری بوجود آید. از آنجا که میلین منبع اصلی ائتلاف پروتونهای باند شده به ماکرومولکولها می‌باشد، تصویربرداری کمی انتقال مغناطش را نسبت به آسیب وارد شده به فیبرهای میلین دار عصبی حساس می‌کند. اخیراً نیز مطالعات گسترده‌ای در اثبات پتانسیل این روش تصویربرداری در جهت تشخیص بهتر بیماری‌های سیستم اعصاب مرکزی صورت گرفته است. در اکثر این بررسی‌ها، کمی‌سازی پدیده انتقال مغناطش بر مبنای محاسبه نسبت انتقال مغناطش^۲، MTR، بنا شده است که به صورت $MTR = (1 - M_s / M_0) * 100$ تعریف می‌شود. M_0 ، مغناطش در غیاب پالس اشباع و M_s ، مغناطش در زمانی است که پالس اشباع اعمال می‌شود. این پارامتر، معیاری نسبی از کاهش شدت سیگنال، تحت تأثیر اثر انتقال مغناطش و تابع پیچیده‌ای از فرایندهای بسیاری است که در آسایش اسپین شبکه و آسایش مقطعی سهم هستند [۱۱]. آنچه که در تحقیقات صورت گرفته مورد نظر می‌باشد، ارزیابی میزان گسترش بیماری است تا مرحله بالینی بیماری مشخص شده و اثرات درمان بررسی شود. ارتباط بین ناهنجاری‌های MTR و ناتوانی نورولوژیک نیز در چند بررسی‌ای که عمدتاً بر اساس اندازه‌گیری‌های صورت گرفته در ضایعات MS مشاهده شده در تصاویر وزنی T2، ماده سفید ظاهراً نرمال، ماده خاکستری ظاهراً نرمال و کل بافت مغز بوده، گزارش شده است. نتایج تمامی این بررسی‌ها حاکی از آن است که تصویربرداری کمی انتقال مغناطش قادر است به خوبی

1- Edema

2- Magnetization Transfer Ratio

3- Segmentation

number of , matrix size=256*192 , view=25cm
slices=28 (کل زمان تصویربرداری کمی انتقال مغناطش و
تصویربرداری کیفی بالینی ۳۰ دقیقه بود.

۲-۲- پردازش و آنالیز تصاویر

بیماری مالتیپل اسکلروزیس سراسر سیستم اعصاب مرکزی شامل بافت مغز و نخاع را درگیر می‌کند ولی با این وجود، توزیع ضایعات پاتولوژیک در بافت مغز تا حدی مشخص است. همچنین مشاهدات MRI نشان داده است که بیشتر پلاکهای MS در نواحی اطراف بطنی^۳ و داخل ساختار کرپوس کالوسوم^۴ ظاهر می‌شوند. در این تحقیق نیز، با توجه به نواحی آناتومیک مغز که بیشتر درگیر می‌شود، یک مقطع^۵ مشخص از آن، با تأیید پزشک متخصص مغز و اعصاب، جهت ارزیابی پارامتر نسبت انتقال مغناطش در ماده سفید افراد کنترل و بیمار انتخاب شد. این مقطع از مغز به ضخامت ۴ سانتی‌متر بالاتر از مغز میانی قرار داشته و شامل ۱۰ برش^۶ متوالی، هر کدام به ضخامت ۴ میلی‌متر می‌شد. آنالیز پارامتر نسبت انتقال مغناطش، MTR، به صورت پیکسل به پیکسل و با تعریف ریاضی $MTR = (M_0 - M_S) / M_0 \times 100$ صورت گرفت. M_0 و M_S به ترتیب نمایانگر شدت سیگنال پیکسل، بدون و با اعمال پالس انتقال مغناطش هستند شکل (۲).

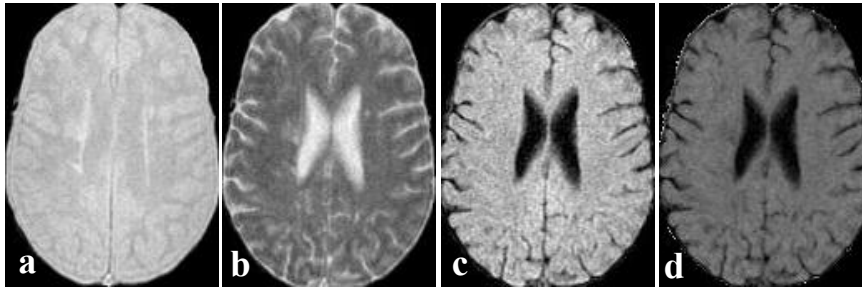
(محدوده سنی ۲۴-۴۰ سال) بود. کلیه مراحل این تحقیق با کسب رضایت از بیماران و داوطلبان سالم انجام گرفت.

۱-۲- تصویربرداری MRI

تصویربرداری MRI با یک سیستم MRI ساخت شرکت جنرال الکتریک، مدل LX با مگنت ۱/۵ تسلا و با استفاده از یک کویل سر استاندارد انجام گرفت. پروتکل‌های تصویربرداری بالینی به شرح زیر بودند: تصاویر وزنی T2-FSE آگزیمال (3000ms/80ms/1[TR/TE/excitation])، تصاویر وزنی T1-SE آگزیمال (400ms/9ms/1[TR/TE/excitation]) و تصاویر FLAIR آگزیمال (9000ms/95ms/2140ms/1[TR/TE/TI/excitation]) از آنجا که جهت تعیین دقیق پارامترهای مرتبط با تصویربرداری انتقال مغناطش نیاز به یک توالی پالس، با نسبت سیگنال به نویز بالا است، بنابراین در تصویربرداری کمی MT از تکنیک ارائه شده توسط فینلی^۱ که همان کاربرد توالی پالس spoiled (SPGR) 3D gradient echo است همراه با اعمال کمی اصلاحات استفاده شد [۱۶]. از دیگر مزیت‌های این تکنیک، فراهم ساختن امکان تصویربرداری از کل بافت مغز در یک زمان نسبتاً قابل قبول از لحاظ کلینیکی می‌باشد. پروتکل مورد استفاده در تصویربرداری کمی انتقال مغناطش، شامل توالی پالس 3D-SPGR ($\alpha=5^\circ, 30^\circ$, $27ms/5ms/[TR/TE]$ می‌شد که تحت 5° همراه با اعمال پالس اشباع کننده نیز بود. پالس انتقال مغناطش با مشخصه یک پالس فرمی^۲ شکل با توان 670° ، به مدت زمان ۸ میلی‌ثانیه و 1600 هرتز فاصله از فرکانس تشدید آب آزاد اعمال گردید. به این ترتیب دو مجموعه تصاویر آگزیمال با کتراستهای متفاوت بدست آمد. پارامترهای هندسی توالی پالس در تصویربرداری‌های بالینی و انتقال مغناطش، مشابه و به شرح زیر بودند: (slice thickness=4mm, filed of [FOV]).

3- Periventricular
4- Corpus Callosum
5- Slab
6- Slice

1- Finelli
2- Fermi



شکل ۲- (a) تصویر اخذ شده بدون اعمال پالس MT (b) تصویر اخذ شده با اعمال پالس MT (c) اختلاف دو تصویر a و b (d) نقشه MTR بافت مغز

برنامه FSL، از برنامه‌های بسیار قدرتمند برای کار با تصاویر MRI بوده و شامل ابزارهای مختلفی از جمله BET^۷، FAST^۸ و FLIRT^۹ می‌باشد که در این تحقیق نیز مورد استفاده قرار گرفتند. از میان مجموعه تصاویر بدست آمده با پروتکل 3D-SPGR دو سری تصاویر بدست آمده با و بدون اعمال پالس انتقال مغناطش تحت زاویه تلنگر ۵° به منظور محاسبه پارامتر MTR استفاده شد. پس از حذف بافت‌های غیر مغز^{۱۱} از این دو مجموعه تصاویر به کمک ابزار BET، فرایند ثبت کردن^{۱۱} آنها با ابزار FLIRT و تحت الگوریتم Mutual Information روی سری تصاویر 3D-SPGR با زاویه تلنگر ۳۰° که به عنوان سری تصاویر مرجع انتخاب شده بودند، انجام شد. همچنین با کمک ابزار FAST بخش بندی ماده سفید مغز روی سری تصاویر بدست آمده با پروتکل 3D-SPGR تحت زاویه تلنگر ۳۰° که از کنتراست خوب T1 در میان بافت‌های نرم برخوردار بود، صورت گرفت (شکل ۳). بدین ترتیب یک ماسک از بافت سفید مغز ساخته شد. این روش امکان آنالیز مجزای ماده سفید مغز را فراهم می‌کند.

علاوه بر اندازه‌گیری پارامتر MTR بافت سفید مغز، تغییرات پارامترهای هیستوگرام MTR مانند: بلندی پیک، موقعیت پیک و درصدهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ (نمایش دهنده ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ سطح زیر منحنی) نیز در ماده سفید ظاهراً نرمال^۱، NAWM، بیماران در مقایسه با ماده سفید نرمال افراد کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت. پلاکهای MS برحسب شدت سیگنالشان نسبت به شدت سیگنال ماده سفید مغز در تصاویر وزنی T1، به سه دسته تقسیم شدند: پلاکهای هم شدت با ماده سفید^۲، پلاکهایی که شدت سیگنال آنها کمتر از ماده سفید ولی بیشتر از ماده خاکستری است^۳ و همچنین پلاکهایی که شدت سیگنالی مشابه با مایع مغزی نخاعی^۴ دارند. در روند ارزیابی پارامتر MTR ابتدا نقشه^۵ آن با نرم افزار MATLAB پیکسل به پیکسل محاسبه می‌شود. سپس ماسک‌های ماده سفید و پلاک‌ها که با نرم افزار FSL^۶ ساخته شده‌اند بر روی نقشه پارامتر MTR اعمال می‌گردد. با استخراج پیکسل‌های مربوط به ماده سفید مقطع مورد آنالیز مغز و انواع پلاکهای MS، از مقادیر آنها میانگین‌گیری شده و نهایتاً کمیت MTR در آن آسیب و یا ساختار آناتومیکی مورد نظر مغز محاسبه می‌شود. همان طور که گفته شد برای بخش بندی ماده سفید و خاکستری مغز از نرم افزار FSL استفاده شد.

7- Brain Extraction Tool
8- FMRIB's Automated Segmentation Tool
9- FMRIB's Linear Image Registration Tool
10- Extracranial
11- Registration

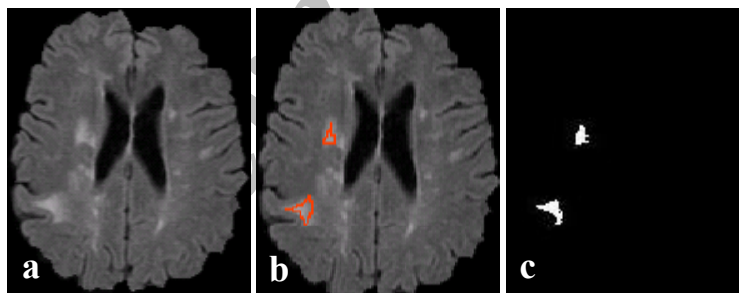
1- Normal Appearing White Matter
2- Isointense
3- Mildly Hypointense
4- Severely Hypointense
5- Map
6- FMRIB Software Library



شکل ۳- (a) حذف بافت‌های extracranial به کمک ابزار BET از نمونه تصویر 3D-SPGR بدست آمده تحت زاویه تلنگر $\alpha = 30^\circ$ برای یک برش مغز فرد نرمال. نتایج بخش‌بندی آن به کمک ابزار FAST نیز در شکل نشان داده شده است: (b) ماده سفید (c) ماده خاکستری و (d) مایع مغزی نخاعی

ظاهراً نرمال بدست آمد و بر روی نقشه MTR که پیش از این محاسبه شده بود، اعمال گردید. همچنین از ماسک ساخته شده برای پلاکها به منظور بخش‌بندی آنها نیز استفاده شد تا مقدار پارامتر MTR در انواع پلاکهای دسته‌بندی شده بر حسب میزان کاهش شدت سیگنال در تصاویر وزنی T1، محاسبه شود. کلیه مراحل ماسک کردن پلاکها و دسته‌بندی آنها زیر نظر یک رادیولوژیست با تجربه انجام شد (شکل ۴).

ساخت ماسک برای پلاکهای MS نیز به صورت دستی و با ابزارهای موجود در برنامه FSL، روی تصاویر FLAIR ثبت شده بر سری تصاویر SPGR با زاویه تلنگر 30° انجام گرفت. سپس ماسک پلاکها بر روی نتایج بخش‌بندی ماده سفید بیمار اعمال گردید تا تمامی پیکسل‌های مربوط به پلاکهای MS از ماده سفید بخش‌بندی شده حذف شوند. با حذف پیکسل‌های مربوط به پلاکها، ماسک ماده سفید



شکل ۴- (a) تصویر FLAIR ثبت شده بیمار مبتلا به MS (b) نحوه ماسک کردن پلاکهای MS زیر نظر رادیولوژیست و (c) نتیجه نهایی بخش‌بندی پلاک MS

جداگانه ماسک شدند، ولی ارزیابی نهایی آنها به صورت حجمی صورت گرفت. بدین ترتیب که به هر بیمار یک مقدار به پارامتر MTR انواع پلاکها، شامل (Severely , Isointense , Hypointense Hypointense MS) نسبت داده شد. با ارزیابی حجمی پلاکهای MS، هماهنگی بین تعداد داده‌های MTR بدست آمده برای هر یک از انواع پلاکها با داده‌های MTR ماده سفید ظاهراً نرمال

در مجموع تعداد ۸۶ پلاک از نوع Isointense ، ۴۰ پلاک از نوع Mildly Hypointense و ۸ پلاک از نوع Severely Hypointense به منظور بررسی نحوه تغییرات پارامتر نسبت انتقال مغناطش در آسیب‌های MS، مورد ارزیابی قرار گرفت. ماسک‌های ساخته شده برای پلاکها، شکلهای نامنظم داشته و حداقل تعداد ۱۴ پیکسل و حداکثر تعداد ۶۳ پیکسل را شامل می‌شدند. با وجود اینکه هر یک از پلاکها

تفاوت معنی‌دار آماری پارامتر MTR میان پلاکهای Mildly و Severely مورد استفاده قرار گرفت.

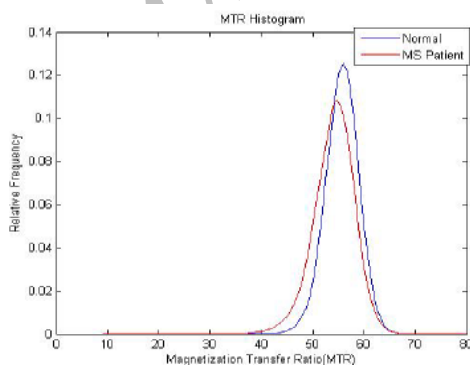
۳- نتایج

تغییرات میکروسکوپی رخ داده در ماده سفید مغز، بخش قابل توجهی از آسیب وارد شده به آن را در بیماری MS تشکیل می‌دهد که نشان‌دهنده اهمیت ویژه ارزیابی کمی ماده سفید ظاهراً نرمال حتی نسبت به پلاکها می‌باشد. در شکل ۵- (a) هیستوگرام MTR بدست آمده از بافت سفید مغز برای گروههای کنترل و بیمار نشان داده شده است. نسبت به گروه کنترل، هیستوگرام MTR در بیماران به سوی چپ جابجا می‌شود که نمایش‌دهنده افزایش تعداد پیکسلهای با مقادیر کم MTR، در ماده سفید ظاهراً نرمال بیماران در مقایسه با ماده سفید نرمال افراد کنترل می‌باشد. بلندی پیک هیستوگرام در افراد بیمار نیز نمایش‌دهنده مقدار بافت سفید از مغز است که تحت تأثیر بیماری قرار نگرفته است. شکل ۵- (b) تغییرات پارامتر MTR در دو گروه کنترل و بیمار را به صورت نمودار نمایش می‌دهد. کاهش میانگین پارامتر MTR در ماده سفید حجم مورد آنالیز مغز هر یک از بیماران، در مقایسه با هر یک از افراد نرمال، در این نمودار مشاهده می‌شود.

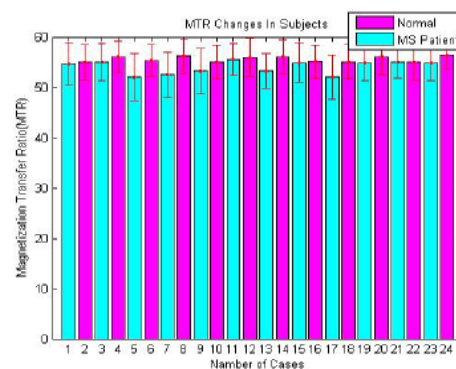
جهت آنالیز آماری فراهم گردید. همه بیماران پلاکهای از نوع Isointense و Mildly Hypointense را داشتند در حالی که تنها پنج بیمار دارای پلاک از نوع Severely Hypointense بودند.

۳-۲- آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها و تجزیه و تحلیل آنها با نرم افزار آماری SPSS-11.5 انجام گرفت. پس از تأیید توزیع نرمال داده‌ها، جهت ارزیابی تغییرات پارامتر MTR و همچنین پارامترهای هیستوگرام آن در ماده سفید مغز میان دو گروه نرمال و بیمار، از آزمون پارامتریک Independent-Samples T-Test استفاده شد. مقایسه مقدار پارامتر نسبت انتقال مغناطش بین انواع پلاکهای MS با یکدیگر و همچنین نسبت به ماده سفید ظاهراً نرمال، با استفاده از آزمون آماری پارامتریک، Repeated Measures ANOVA و Pairwise Comparison و با تصحیح روش Bonferroni انجام گرفت. فرض شد که تصحیح Bonferroni در سطح $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار است. به علت تعداد کم پلاکهای Severely Hypointense آنالیز شده در مقایسه با دیگر انواع پلاکها، آزمون آماری ناپارامتریک Wilcoxon-Rank جهت بررسی



(a)



(b)

شکل ۵- (a) مقایسه هیستوگرام MTR بافت سفید مغز بین دوازده بیمار مبتلا به MS (خط قرمز) و دوازده مورد کنترل (خط آبی). کل ساختار هیستوگرام در بیماران به سوی چپ جابجا شده است. (b) نمودارهای نمایشگر تغییرات پارامتر MTR در ماده سفید هر یک از افراد گروههای کنترل و بیمار

پلاکهای MS با تصویربرداری کمی انتقال مغناطش

همچنین سوم ($p = 0/002$) در ماده سفید ظاهراً نرمال بیماران در مقایسه با ماده سفید نرمال افراد سالم بدست آمد. همچنین در گروه بیمار کاهش معنی دار ارتفاع پیک هیستوگرام نسبت به گروه کنترل ($p = 0/01$) را می توان مشاهده نمود. کاهش محسوس پارامترهای هیستوگرام MTR در ماده سفید به ظاهر نرمال پس از حذف پیکسلهای مربوط به ناحیه پلاک MS از آن، به تشخیص میزان ناهنجاریهای رخ داده، جدا از آسیبهای قابل دیدن در تصاویر وزنی T2 کمک می کند.

مقادیر میانگین و انحراف معیار پارامتر MTR بافت سفید مغز و همچنین پارامترهای مرتبط با هیستوگرام آن برای گروههای کنترل و بیمار در جدول ۱ آمده است. مقدار پارامتر MTR ماده سفید ظاهراً نرمال بیماران، در مقایسه با ماده سفید نرمال گروه کنترل کاهش معنی دار آماری را نشان می دهد ($0/001 < p$). همچنین می توان تفاوت معنی دار آماری در پارامترهای هیستوگرام MTR را بین گروههای کنترل و بیمار مشاهده نمود. کاهش معنی دار مقادیر موقعیت پیک ($0/001 < p$) در صداهای اول ($0/001 < p$)، دوم ($0/001 < p$) و

جدول ۱- مقایسه مقادیر پارامترهای هیستوگرام MTR ماده سفید مغز، بین گروه بیماران مبتلا به MS از نوع عودکننده - بهبودیابنده و گروه کنترل

پارامترها	افراد نرمال		افراد بیمار		مقادیر P
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	
MTR میانگین	۵۵/۶۲	۲/۸۳	۵۴/۰۷	۲/۹۴	$< 0/001$
بلندی پیک منحنی	۰/۱۲۶	۰/۰۱	۰/۱۱۰	۰/۰۲	$0/01$
موقعیت پیک منحنی	۵۵/۹۴	۰/۶۹	۵۴/۵۵	۱/۱۰	$< 0/001$
درصد اول (MTR ₂₅)	۵۳/۵۶	۰/۶۵	۵۱/۶۳	۱/۴۸	$< 0/001$
درصد دوم (MTR ₅₀)	۵۵/۷۲	۰/۵۷	۵۴/۲۲	۱/۱۱	$< 0/001$
درصد سوم (MTR ₇₅)	۵۷/۸۰	۰/۵۶	۵۶/۶۷	۰/۹۳	$0/002$

جدول ۲- مقادیر میانگین و انحراف معیار پارامتر MTR بدست آمده در NAWM و انواع پلاکهای MS

انواع پلاکهای MS	n	MTR(%)		مقادیر P
		± میانگین	انحراف معیار	
NAWM	۱۲	۵۴/۰۷±۲/۹۴		
Isointense	۱۲	۴۷/۳۶±۳/۲۸		$P < 0/0001^a$
Mildly Hypointense	۱۲	۴۱/۱۷±۳/۲۳		$P < 0/0001^b$
Severely Hypointense	۵	۳۵/۷۷±۴/۵۹		$P = 0/02^c$

^a در مقایسه با ماده سفید ظاهراً نرمال (NAWM)

^b در مقایسه با پلاکهای Isointense

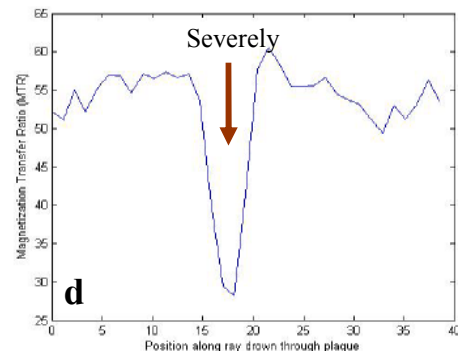
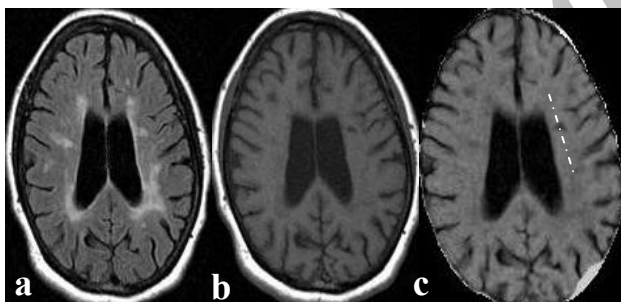
^c در مقایسه با پلاکهای Mildly Hypointense

همچنین مقادیر میانگین و انحراف معیار پارامتر MTR در ماده سفید ظاهراً نرمال و انواع پلاکهای MS، به همراه نتایج آنالیز آماری آنها در جدول ۲ آمده است.

کاهش تدریجی مقادیر MTR در همه انواع پلاکهای MS، نسبت به ماده سفید ظاهراً نرمال، متناسب با کاهش تدریجی شدت سیگنال پلاکها در تصاویر وزنی T1 می باشد. پلاکهای از نوع Isointense که با شدت سیگنالی مشابه با ماده سفید مغز در تصاویر T1 دیده می شوند، کاهش معنی دار مقدار MTR ($p < 0/0001$) را نسبت به ماده سفید ظاهراً نرمال نشان می دهند. از طرفی مقدار پارامتر MTR در پلاکهای از نوع Mildly Hypointense که دارای شدت سیگنالی کمتر از ماده سفید و بیشتر از ماده خاکستری در تصاویر T1 هستند، نیز کاهش

فیبرهای میلین رخ داده و بافت دچار گلیوز^۱ شده است به نحوی که امکان بازسازی مجدد میلین در آنها وجود ندارد. با کاهش تدریجی نسبت انتقال مغناطش در ماده سفید مغز، می‌توان تخریب شدیدتر ساختار ماکرومولکولی میلین و در مقابل افزایش پروتوئینهای آزاد و ایجاد محیط آب دوست را انتظار داشت.

در شکل ۶- نمایه‌ای از تغییرات پارامتر MTR در پلاک نوع Severely، نشان داده شده است. رسم نمایه از روشهای نشان دادن میزان دگرگونی و تغییرات هیستوپاتولوژیکی است که در پلاکهای MS رخ می‌دهد. این روش از تکنیکهای آنالیز ناحیه هدف ROI، محسوب شده و قادر به ارائه اطلاعات ارزشمندی از میزان تخریب میلین در مرکز و مرزهای پلاک میباشد. نمایه رسم شده برای این پلاک نیز نمایش‌دهنده کمترین مقدار MTR در مرکز آن است و در تأیید این فرضیه می‌باشد که در یک پلاک MS، روند التهاب و تخریب میلین از مرکز پلاک به سوی مرزها گسترش می‌یابد [۱۷].



شکل ۶- تصاویر (a) FLAIR، (b) T1-SE و (c) نقشه MTR از مغز یک بیمار مبتلا به MS. (d) نمایه‌ای از تغییرات پارامتر MTR در پلاک نوع Severely Hypointense

بلکه به ماده سفید ظاهراً نرمال اطراف آن نیز گسترش می‌یابد. تصویربرداری کمی انتقال مغناطش به دلیل ماهیت حساس بودن به تخریب ساختار ماکرومولکولی میلین و ایجاد محیط دارای پروتوئینهای آزاد به جای آن، که مشخصه بیماری MS نیز به‌شمار می‌رود، قادر به ارزیابی دگرگونیهای هیستوپاتولوژیک و روند تخریب میکروسکوپی فیبرهای میلین، در بیماران مبتلا به MS می‌باشد. ارزیابی میزان تخریب میلین در پلاکهای دسته‌بندی شده بر

۴- بحث و نتیجه‌گیری

تصویربرداری کلینیکی MRI به خوبی از قابلیت آشکارسازی ضایعات متمرکز بیماری MS در بافت مغز برخوردار است. از این روی یکی از ابزارهای پاراکلینیکی قدرتمند در تشخیص و ارزیابی مؤثر بودن روند درمان دارویی در بیماران مبتلا به MS به‌شمار می‌رود. از طرفی مطالعات بالینی نشان داده‌اند که تغییرات پاتولوژیک، تنها به این ضایعات متمرکز یا همان پلاکهای MS محدود نشده

1- Gliosis
2- Region of Interest

کاهش معنی‌دار تمامی این پارامترها را مشاهده نمود که مطابق با یافته‌های قبلی است [۲۰ و ۲۱]. نتایج حاصل از آنالیز هیستوگرام MTR نشان می‌دهد که حضور یک پاتولوژی گسترده و شدید میکروسکوپی در ماده سفید مغز از عوامل جدی و مهم تأثیرگذار بر روند پیشرفت بیماری و میزان ناتوانی بالینی در بیماران MS به-شمار می‌رود [۲۲]. هدف از این تحقیق، کمی‌سازی تغییرات ساختاری ماده سفید و پلاکهای MS بر مبنای آنالیز حجمی و ناحیه‌ای تصاویر انتقال مغناطش بود که همراه با آنالیز هیستوگرام MTR بافت سفید مغز، امکان ارزیابی موفقیت‌آمیز تغییرات پاتولوژیک آسیب‌های مختلف MS و همچنین ماده سفید مغز و میزان درگیر شدن آنها در گروه بیماران مبتلا به MS از نوع عودکننده و بهبودیابنده را فراهم نمود. اندازه‌گیری‌های مرتبط با پارامترهای مدل انتقال مغناطش، امیدهای بزرگی را در ارتباط با افزایش ویژگی و حساسیت در تشخیص مراحل تحول بافت مغز در اختیار محققین می‌گذارد و می‌توان انتظار داشت که حتی تأثیر مداخلات درمانی را نیز در بیماران مورد ارزیابی قرار داده و بهبود بخشد.

۵- تشکر و قدردانی

مولفین بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تصویربرداری و مرکز تحقیقات مغز و اعصاب بیمارستان امام خمینی اعلام می‌دارند. همچنین از همکاری صمیمانه خانمها حقیقت و رضازاده سپاسگزاری می‌شود.

اساس میزان کاهش شدت سیگنال در تصاویر وزنی T1 با آنالیز ناحیه‌ای در موقعیت پلاک صورت می‌گیرد و اطلاعات ارزشمندی از فرایندهای پاتولوژیک مختلف سهیم در دگرگونی بافت مغز مانند ادم، التهاب، تخریب دیواره آکسونی و دمیلائیناسیون در اختیار می‌گذارد [۱۸]. آنالیز حجمی در تصویربرداری کمی انتقال مغناطش، مبنای آنالیز هیستوگرام MTR بوده و در جهت غلبه بر محدودیت‌های آنالیز ناحیه‌ای در ارزیابی بافتهای سفید و خاکستری مغز ارائه شده است. این تکنیک از این مزیت برخوردار است که اطلاعات مربوط به بافت مغز را در جریان ارزیابی میزان کل آسیب وارد شده به آن استنتاج می‌کند. در این تحقیق نیز جهت محدود ساختن خطای تکرار پذیری کاربر، از روش بخش‌بندی نیمه اتوماتیک به منظور استخراج ماسک ماده سفید مغز و اعمال آن بر نقشه MTR جهت آنالیز حجمی پارامترهای هیستوگرام آن استفاده شد [۱۹]. در افراد سالم هیستوگرام MTR دارای شکل مشخصی است که با یک پیک تیز و منفرد تشخیص داده می‌شود. این شکل خاص پیک نشان می‌دهد که در افراد نرمال، بخش عمده بافت سفید مغز طیف محدودی از مقادیر MTR را در بر دارد و حاکی از آن است که ماده سفید مغزهای نرمال دارای یکنواختی نسبی از نظر مشخصه MTR می‌باشد. در حالی که محدوده تغییرات MTR در بیماران مبتلا به MS وسیعتر بوده که با جابجایی کل هیستوگرام به سوی چپ نیز همراه می‌باشد. این جابجایی با کاهش پارامترهای درصد، MTR₂₅، MTR₅₀ و MTR₇₅ در گروه بیمار مشخص می‌شود. همچنین با مقایسه میانگین MTR ماده سفید مغز و پارامترهای هیستوگرام آن در بیماران، نسبت به گروه کنترل، می‌توان

منابع

1. Fernando KTM, Tozer DJ, Miskiel KA, Gordon RM, Swanton j K, Dalton CM, et al. Magnetization Transfer Histograms in Clinically Isolated Syndromes Suggestive of Multiple Sclerosis. Brain. 2005; 128:2911-2925.
2. Iannuci G, Tortorella C, Rovaris M, Sormani MP, Comi G, Filippi M. Prognostic Value of MR and Magnetization Transfer Imaging Findings in Patients with Clinically Isolated Syndromes Suggestive of Multiple Sclerosis at Presentation. AJNR 2000; 21:1034-1038.

3. Iannucci G, Rovaris M, Giacomotti L, Comi G, Filippi M. Correlation of Multiple Sclerosis Measures Derived from T2-Weighted, T1- Weighted, Magnetization Transfer, and Diffusion Tensor MR Imaging. *AJNR Am. J. Neuroradiol* 2001; 22:1462-1467.
4. Wolff SD, Balaban RS. Magnetization Transfer Contrast (MTC) and Tissue Water Proton Relaxation in Vivo. *Radiology* 1989; 10: 135-144.
5. De Boer RW. Magnetization transfer contrast Part1: MR physics. Philips Medical System, Best, the Netherlands 1996: 64-73.
6. Yeung HN, Aisen AM. Magnetization Transfer Contrast with Periodic Pulsed Saturation. *Radiology* 1992; 183: 209-214.
7. Wolff SD, Balaban RS. Magnetization Transfer Imaging: Practical Aspects and Clinical Applications. *Radiology* 1994; 192: 593-599.
8. Sled JG, Pike GB. Quantitative imaging of magnetization transfer exchange and relaxation properties in vivo using MRI. *Magn Reson Med* 2001; 46: 923-931.
9. Henkelman RM, Stanisz GI, Graham SJ. Magnetization Transfer in MRI: A Review. *NMR Biomed* 2001; 14: 57-64.
10. Ramani A, Dalton C, Miller DH, Tofts PS, Barker GJ. Precise Estimate of Fundamental in-vivo MT Parameters in Human Brain in Clinically Feasible Times. *Magn Reson Imaging* 2002; 20: 721-731.
11. Dousset V, Grossman RI, Rammer KN, Schnall MD, Young LH, Gonzalez-Scarano F, et al. Experimental Allergic Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis: Lesion Characterization with Magnetization Transfer Imaging. *Radiology* 1992; 182: 483-491.
12. Grimaude M, Barker GJ, Wange L, Lai M, Macmanus DG, Webb SL, et al. Correlation of Magnetic Resonance Imaging Parameters with Clinical Disability in Multiple Sclerosis. *J Neurol* 1999; 246:961-967.
13. Ge Y, Grossman RI, Udupa JK, Babb JS, Kolson DL, McGowan JC. Magnetization Transfer Ratio Histogram Analysis of Gray Matter in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *AJNR* 2001; 22:470-475.
14. Van Buchem MA, Grossman RI, Armstrong C, Polansky M, Miki Y, Heyning FH, et al. Correlation of Volumetric Magnetization Transfer Imaging with Clinical Data in MS. *Neurology* 1998; 50:1609-1617.
15. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 121-127.
16. Finelli DA, Reed DR. Flip Angle Dependence of Experimentally Determined T1sat and Apparent Magnetization Transfer Rate Constants. *J Magn Reson Imaging* 1998; 8: 548-553.
17. Pertrella JR, Grossman RI, McGowan JC, Cohen JA. Multiple Sclerosis Lesions: Relationship between MR Enhancement Pattern and Magnetization Transfer Effect. *AJNR* 1996; 17:1041-1049.
18. Loevner LA, Grossman RI, McGowan JC, Ramer KN, Cohen JA. Characterization of Multiple Sclerosis Plaques with T1- Weighted MR and Quantitative Magnetization Transfer. *AJNR* 1995; 16: 1473-1479.
19. Van Buchem MA, Udupa JK, McGowan JC, Miki Y, Heyning FH, Boncoeur-Martel MP, et al. Global Volumetric Estimation of Disease Burden in Multiple Sclerosis Based on Magnetization Transfer Imaging. *AJNR* 1997; 18:1287-1290.
20. Adams CWM. Pathology of Multiple Sclerosis: Progression of the Lesion. *Br Med Bull.* 1977; 33:15-20.
21. Allen IV, McKeown SR. A Histological, Histochemical and Biochemical Study of the Macroscopically Normal White Matter in Multiple Sclerosis. *J Neurol Sci* 1979; 41:81-91.
22. Van Buchem MA, McGowan JC, Grossman RI. Magnetization Transfer Histogram Methodology: Its Clinical and Neuropsychological Correlates. *Neurology* 1999; 53:3-8.