

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Veća održanoj 22.12.2011.godine određena je Komisija za ocenu završne doktorske disertacije kandidata Mr. Sci. Med dr Katarine Kačar pod nazivom „**Korelacija nalaza Magnetne Rezonance mozga i neuropsihološkog testiranja kod obolelih od multiple skleroze**“ (Mentor: Prof dr Tatjana Stošić-Opinćal; Komentori: Prof dr Jelana Drulović i Prof dr Massimo Filippi) u sledećem sastavu:

Akademik Prof dr Vladimir Kostić, predsednik

Prof dr Duško Kozić, član komisije

Prof dr Đorđije Šaranović, član komisije

Članovi Komisije su detaljno proučili priloženu disertaciju i podnose Veću sledeći

I Z V E Š T A J

A. Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija „**Korelacija nalaza Magnetne Rezonance mozga i neuropsihološkog testiranja kod obolelih od multiple skleroze**“ obuhvata sedam poglavlja: uvod, radnu hipotezu, ciljeve rada, materijal i metode, rezultate, diskusiju i zaključke. Rad je prikazan na 125 kucanih strana, sadrži ukupno 32 priloga (14 slika, 3 tabele, 15 grafikona). Na kraju disertacije dat je pregled citirane literature u vidu 227 literaturnih podataka.

Uvod je podeljen u deset manjih celina. U prva tri dela uvoda su prikazana dosadašnja saznanja o multiploj sklerozi (MS) i problemima dijagnostikovanja oboljenja. Pored toga, detaljno su prikazane, do sada priznate i definisane forme MS-a, njihova korelacija sa kliničkim i neuropsihološkim testiranjem (NPT). Poseban deo uvoda (četvrti, peti i šesti) se odnosi na ulogu standardnih (sMR) tehnika magnetne rezonance (MR) u pokušanju dijagnostikovanja različitih podtipova MS-a. U narednim celinama (sedmi, osmi, deveti i deseti) kandidat se bavi ulogom naprednih MR tehnika. Detaljno su prikazani dokazi koji govore u prilog uloge naprednih MR tehnika, sa posebnim osvrtom na ulogu difuzionih MR tehnika u dijagnostici MS oboljenja.

Da bi se bar delimično rasvetlila uloga sMR i nMR tehnika i njihova korelacija sa NPT u MS Dr Katarina Kačar je postavila *radne hipoteze*:

- * očekuje se da se kognitivni deficit češće ispoljava kod pacijenata sa progresivnim formama MS u poređenju sa onima sa relapso-remitentnom formom bolesti;
- * da je difuzno oštećenje aksona u NNBM i kortikalna demijelinizacija (NNSM) dominantna karakteristika PPMS i SPMS, dok je za RRMS karakteristična pojava fokalnih inflamatornih promena bele mase;
- * da se upotrebom nMRI tehnika kvantifikuje ne samo stepen oštećenja unutar T2W hiperintenznih i postkontrastnih T1W lezija, već se pruža mogućnost određivanja stepena oštećenja unutar NNBM i NNSM sa velikom specifičnošću za određivanje stepena oštećenja mijelina i aksona i da se upotrebom sMR teže detektuju kortikalne lezije, nego korišćenjem nMRI
- * da već zapremina i rasprostranjenost oštećenja bele mase dovodi do interhemisferičnog i interregionalnog oštećenja mozga, što za posledicu ima razvoj kognitivnih oštećenja kod obolelih od MS.

U skladu sa hipotezama, postavljeni su i *ciljevi rada*:

1) Ispitivanje kognitivnog statusa i stepena neurološke onesposobljenosti kod obolelih od multiple skleroze sa različitim fenotipovima bolesti.

2) Analiza oštećenja moždanog parenhima primenom standardnih i naprednih MR tehnika mozga s obzirom na pretpostavku da je difuzno oštećenje aksona u NNBM i kortikalna demijelinizacija u NNSM, koje se detektuju nMR tehnikama, dominantna karakteristika PPMS i SPMS, dok se karakterističnom za RRMS smatra pojava fokalnih inflamatornih promena bele mase.

3) Ispitivanje povezanost između kognitivnih poremećaja i oštećenja moždanog parenhima, detektovanih primenom standardnih i naprednih MR tehnika kod obolelih od MS.

U poglavlju *Materijal i metode* opisano je istraživanje u koje su sukcesivno uključivani bolesnici sa klinički sigurnom MS (Polman i sar 2005) koji su bolnički ispitivani i lečeni na Odeljenju za imunski-posredovane bolesti CNS, Instituta za neurologiju, Kliničkog Centra Srbije (KCS) u Beogradu u periodu od januara 2007. do januara 2009. godine. Pregledana su 102 pacijenta (žene/muškarci= 69/33; prosečna starost = 42g, raspon 19-61g; SD = 11), srednje dužine trajanja bolesti 9.81g (raspon od 0-40g, SD = 9,66). Srednja vrednost EDSS skora je iznosila 3.5 (raspon = 0.0-8.5; SD = 2,13). U okviru ove grupe bolesnika, 20 je imalo relapsno remitentnu fazu bolesti (RRMS – Lublin i Reingold, 1996), 23 primarno progresivnu fazu (PPMS- Montalban i sar, 2009); 19 sekundarno progresivnu fazu MS (SPMS- Lublin i Reingold, 1996). Takodje je ispitano i 20 bolesnika sa klinički izolovanim sindromom koji sugeriše MS (CIS MS – Polman i sar, 2005, 2011), kod kojih u vreme ispitavanja nisu ispunjeni kriterijumu za dijagnozu multiple skleroze. Posebno je analizirana grupa od 20 bolesnika sa RRMS koji imaju karakteristike benigne forme MS (BMS – EDSS ≤ 3 ; trajanje bolesti ≥ 15 g; Hawkins i McDonnell, 1999; Pittock i sar, 2004).

Funkcionalni neurološki deficit je procenjivan na osnovu primene proširene skale stepena onesposobljenosti (**Expanded Disability Status Scale [EDSS] (Kurtzke, 1983)**). Ova skala se sastoji od 8 funkcionalnih sistema (FS), odnosno boduju se sledeći funkcionalni sistemi: 1) piramidni (PFS), 2) cerebralni (CFS), 3) moždano stablo (MSFS), 4) senzitivni (SFS), 5) sfinkteri mokraćne bešike i creva (BBFS), 6) vizuelni (VFS), 7) cerebelarni (CLFS). Pored toga se procenjuje dužina puta koju bolesnik može preći po ravnom bez odmora do zamora (8- ambulation).

Za svaki FS se dobija zaseban skor, a zatim se ukupni EDSS određuje na osnovu vrednosti skorova svih FS. Ovaj skor ima vrednosti u intervalu od 0 (normalan neurološki nalaz bez obzira na simptome) do 10 (smrt kao posledica MS).

U studiju je uključeno i 38 **zdravih ispitanika** (23 žene, 15 muškaraca), koji su upareni po polu i strasnoj dobi sa pacijentima obolelim od MS, prosečne starosti 38 godina (prosek 21-61g).

Etički Komitet Medicinskog Fakulteta u Beogradu je odobrio obavljanje ove studije, a svi ispitanici uključeni u ovu studiju su prethodno informisani o protokolu ispitivanja i potpisali pristanak za učešće u studiji.

Kod svih pacijenata je u roku od 48h od MR pregleda, pored neurološkog pregleda i procene stepena onesposobljenosti primenom EDSS skale, obavljeno je i neuropsihološko testiranje (NPT). Svi pacijenti su neuropsihološki testirani od strane neuropsihologa koji nije imao uvid ni u klinički nalaz pacijenata, ni u nalaz na magnetnoj rezonanci.

Primenjena je standardna kratka baterija neuropsiholoških testova za skrining kognitivnog statusa pacijenata obolelih od MS-a (Standard Brief Repeatable Battery of Neuropsychological tests (BRB-NT) (Rao i sar, 1990; Borina i sarad, 2001).

BRB-NT je sastavljena iz validnih, pouzdanih, standardizovanih i normativnih parametara koji pomažu u proceni i kvantifikovanju promena ponašanja koje mogu nastati kao posledica MS oštećenja, ali i poremećaja CNS druge etiologije.

Kognitivni domeni koji se ispituju ovim testovima su: jezik/govor, pažnja/koncentracija, vizuoprostorna percepcija i konstruktivne sposobnosti, egzekutivne

funkcije frontalnih režnjeva, verbalno i neverbalno učenje i pamćenje. BRB-N baterija se sastoji od nekoliko testova:

Test selektivnog pamćenja i verbalne memorije - Selective Reminding test - **(SRT)**;

Test vizuoprostornog učenja i odloženog prisećanja - 10/36 Spatial Recall Test **(SPART)**;

Test analogije simbola i cifara - Symbol Digit Modalities Test **(SDMT)**

Test slušnih signala u razmacima po 3 sekunde - Paced Auditory Serial Addition Task at 3s **(PASAT 3)**;

Lista generisanih reči - Word list generation **(WLG)**.

Svi testovi su rađeni u vreme kada su ispitanici bili najodmorniji, tako da prikupljeni podaci oslikavaju pravo mentalno stanje obolelih od MS. Za izvođenje cele baterije testova u proseku je bilo potrebno između 25 i 35 minuta po bolesniku.

Rezultati istraživanja su detaljno izneti i pregledno prikazani u 3 tabele i 15 grafikona i mogu se podeliti u određene celine.

U prvoj celini su prikazane glavne demografske i kliničke karakteristike ispitanika.

Druga celina se odnosi na korelaciju demografskih i kliničkih karakteristika bolesnika sa i bez kognitivnih deficita. Analizirano je koliki je procenat pacijenata koji imaju kognitivni deficit u odnosu na celu ispitivanu grupu, kao i procenat učestalosti kognitivnih oštećenja u različitim MS formama.

Treća celina Rezultata rada odnosi se na detaljni prikaz rezultata dobijenih analizom MR snimaka i različitih neuropsiholoških testova. Takođe je ispitivana zastupljenost lezija, njihova ukupna zapremina, kao i zahvaćenost NNBM i NNSM u odabranim putevima bele mase.

U poglavlju *Diskusija* (20 strana) dobijeni podaci su detaljno analizirani i upoređeni sa relevantnim podacima iz literature.

Na osnovu svih prikazanih rezultata i diskusije, Dr Katarina Kačar je izvela sledeće *Zaključke*:

1. Ova studija je bila bazirana na prevazilaženju kliničko-radiološkog paradoksa kod pacijenata obolelih od multiple skleroze u cilju ne samo postavljanja tačne i pravovremene dijagnoze, primene adekvatne terapije, već i pokušaju predikcije toka bolesti i procene stepena kognitivnog oštećenja.
2. Ovim radom su analizirani podaci dobijeni, primenom standardnih i naprednih MR tehnika i rezultata NPT kod 102 bolesnika obolela od MS sa različitim kliničkim fenotipovima, što je prema podacima dostupnim iz literature, u ovom trenutku jedini rad takve vrste.
3. Takođe, važan doprinos je primena nove statističke analize –forest random, koja se do sada nije primenjivala u medicinskoj praksi, ali uz napomenu, da upotreba ovog pristupa nije bez ograničenja, specijalno imajući u vidu različiti klinički fenotip, kao i broj ispitanika.
4. Bitan doprinos ovog rada je i da se upotrebom nMRI tehnika kvantifikuje ne samo stepen oštećenja unutar T2W hiperintenznih i postkontrastnih T1W lezija, već se pruža mogućnost određivanja stepena oštećenja unutar NNBM i NNSM sa velikom specifičnošću za određivanje stepena oštećenja mijelina i aksona, kao i da se upotrebom sMR teže detektuju kortikalne lezije, nego korišćenjem nMR.
5. Kada se govori o različitim fenotipovima MS, ovaj rad ukazuje da je difuzno oštećenje aksona u NNBM i kortikalna demijelinizacija (NNSM) dominantna karakteristika PPMS i SPMS, dok je za RRMS karakteristična pojava fokalnih inflamatornih promena bele mase.
6. Bitno je napomenuti da se kognitivni deficit češće ispoljava kod pacijenata sa progresivnim formama MS u poređenju sa onima sa relapso-remitentnom formom bolesti.
7. Dokazano je i da veća zapremina detektovanih T2W lezija primenom MR i rasprostranjenost oštećenja bele mase dovodi do interhemisferičnog i interregionalnog oštećenja mozga, što za posledicu ima razvoj kognitivnih oštećenja kod obolelih od MS.

8. U skladu sa ranijim ispitivanjima i naša studija je pokazala nespornu ulogu DT MR u detekciji patoloških promena u raznim fazama MS, čak i kod pacijenata sa formom CIS. Međutim, ova forma bolesti je tek poslednjih godina zauzela bitno mesto u dijagnostici i kliničkoj predikciji iz razloga što još uvek ne postoje standarizovani testovi za procenu razvoja klinički definitivne MS.
9. U poređenju različitih grupa MS, RRMS i CIS pokazuju gotovo istovetan stepen oštećenja puteva bele mase, što je i bilo za očekivati, imajući u vidu EDSS skorove, kao i vremeski period koji je potreban da protekne između dva napada. Ovo je i poslužilo za postavljanje pretpostavke da pacijenti sa RRMS formom tokom vremena, razvijaju snažne reparatorne i protektivne mehanizme.
10. Još jedan bitan podatak iz našeg istraživanja je da je stepen oštećenja svih analiziranih puteva bele mase kod BMS znatno niži u odnosu na RRMS i SPMS, čime se naravno i može objasniti povoljniji i blaži klinički tok koji BMS pacijenti imaju. Razlika između RRMS i BMS se dominantno odnosi na izražene FA abnormalnosti u prvoj grupi, dok su MD vrednosti između njih slične, čime se sugerše, da se kod BMS najverovatnije razvijaju „spontani“ neuroprotektivni mehanizmi čime se može sprečiti dalje oštećenje aksona, samim tim i posledični aksonalni gubitak. Tome u prilog ide i analiza pravaca difuzivnosti koja je otkrila da se kod RRMS pacijenata u poređenju sa smanjuje aksijalna difuzivnost u većini analiziranih traktova, što upućuje na podatak da su kod BMS pacijenata vlakna bele mase koherentnija, čime se i potvrđuje pretpostavka o manjem stepenu aksonalnog oštećenja.
11. Kao što se i očekivalo, naša studija je pokazala, da su u odnosu na RRMS i PPMS, kod SPMS pacijenata prisutna izražena oštećenja svih ispitivanih nervnih puteva. Međutim, najizraženije razlike vidljive su u poređenju sa BMS, što se prvenstveno ogleda u FA vrednostima, posebno izraženim u onim putevima koji su patoanatomski supstrat lezija motornih funkcija, što ukazuje na progresivno tkivno oštećenje kod SPMS. Za razliku od ove grupe, smatra se da kod BMS pacijenata nije postignut dovoljan „prag“ za strukturalni gubitak čime bi došlo do izmene fiziološkog integriteta sistema.

12. Dalja analiza poređenja u grupama između SPMS i PPMS pokazala su neslaganje između razlike u distribuciji lezija i oštećenja puteva bele mase. Ovi rezultati potvrđuju tvrdnje da kod ovih podtipova različiti patološki mehanizmi mogu usloviti progresiju, što je razumljivo imajući u vidu se Walerijanova aksonska degeneracija manifestuje jasnim makroskopskim lezijama i igra važnu ulogu kod SPMS pacijenata, dok kod PPMS to nije slučaj. To se objašnjava činjenicom da patološke procese kod PPMS karakteriše umeren zapaljenski proces koji se događa u NNBM, nizak nivo fokalne demijelinizacije plakova lokalizovanih u beloj masi i kompletnije faze remijelinizacije.
13. Ovaj rad je bitan i sa aspekta procene potencijalnog i definitivnog oštećenja kognitivnih funkcija. Naime, u zavisnosti od celokupne kohorte ispitivanih pacijenata, procenat pacijenata sa oštećenjem kognitivnih funkcija varira. S tim u vezi, bitna je uloga nMR tehnika, specijalno DT sekvence, imajući u vidu njenu visoku specifičnost za difuziju molekula vode duž glavnih pravaca prostiranja puteva BM, čime se dobija odgovor ne samo o njihovim karakteristikama, već i o raspodeli oštećenja u različitim traktovima BM.
14. Od svih ispitivanih puteva BM, CYN, UF, SCP su identifikovani kao traktovi koji su najčešće zahvaćeni difuznim MS procesima koji imaju korelat sa primenjenim neuropsihološkim testovima, kao i da su njihova oštećenja prediktivni faktor globalnih kognitivnih funkcija.
15. Bitan rezultat ovog istraživanja je da oštećenja CC nisu detektovana kao prediktivni faktor, kako globalnog, tako i pojedinačnog kognitivnog deficita. U osnovi ovakvog rezultata mogu biti različiti faktori: raznovrsnost grupa ispitanika, MR protokol, klinički pristup, odabir statističkih metoda. Shodno tome, sa aspekta budućih istraživanja, biće interesantno razmatrati da li su oštećenja CC korelat težeg stepena kognitivnog deficita.
16. U zaključku se može reći i da ova studija pokazuje kako primena RF metode u analizi MR tehnika može biti značajna za bolje razumevanje kognitivnog propadanja kod MS pacijenata, specijalno imajući u vidu rezultate analize DT MR i njihove povezanosti sa strateškim putevima BM.

B. Opis postignutih rezultata.

U ovom radu prvo su prikazane demografske i kliničke karakteristike ispitanika. Ispitana su 102 pacijenta sa različitim MS formama, od čega je bilo zastupljeno 69 osoba ženskog pola (70.38%) i 33 muškog pola (29.62%). Posmatrajući starost ispitanika, pacijenti sa SPMS su značajno stariji od RRMS pacijenata ($p = 0,0021$), dok su pacijenti sa CIS formom značajno mlađi od svih ostalih MS podtipova (p vrednosti se kreću u rasponu od $p < 0,0001$ do $< 0,005$ za sva izvršena poređenja). Pacijenti sa SPMS formom bolesti imaju značajno duži tok bolesti u odnosu na RRMS ($p < 0,0001$) i PPMS ($p = 0,0005$), dok pacijenti sa BMS imaju najduži tok bolesti u poređenju sa svim ostalim MS tipovima, što je i razumljivo imajući u vidu klinički tok i kriterijum za BMS (u našem ispitivanju za ovu MS formu korišćen je kriterijum koji podrazumeva $EDSS \leq 3$ i trajanje bolesti od najmanje 15 godina - Howkins i McDonnell, 1999; Pittock i sar, 2004, De Stefano i sar, 2006, Calabrese i sar, 2008).

SPMS pacijenti imali su značajno viši EDSS score od drugih ispitivanih grupa (p u rasponu od $< 0,0001$ do $0,037$). Zapremina T2W lezija (lesion load T2 LL) bila je značajno viša u SPMS u odnosu na sve ostale fenotipova (p u rasponu od $< 0,0001$ do $0,009$). Bitno je podsetiti da nijedan od ispitivanih pacijenata, do započinjanja ispitivanja, nije primao imunosupresivnu i imunomodulatornu terapiju, kao i da su u studiju konsektivno uključivani bolesnici u inaktivnoj fazi bolesti i najmanje mesec dana po završetku kortikosteroidne terapije.

U ovoj studiji, od ukupnog broja ispitanih, kod 33 pacijenta (32%) je pronađeno kognitivno oštećenje. Kognitivna oštećenja su bila zastupljenija kod starijih pacijenata, dominantno muškog pola. Takođe je dokazana statistički značajna razlika koja se odnosi na dužinu trajanja bolesti, EDSS skor i ukupan broj hiperintenznih T2 lezija, u poređenju pacijenata sa i bez kognitivnog oštećenja.

Test na kome su postignuti najlošiji rezultati je SDMT (test vizuelni brzine obrade i kontinuirane pažnje) i to kod svih ispitivanih pacijenata, SPART T (test procene vizioprostornog učenja/pamćenja) (33% bolesnika), zatim PASAT (29%), SPART D (20%), WLGS (18%), SRT D (14%), dok je najniži skor na testovima SRT C (8%) i SRT

L (5,9%) pokazao najmanji broj ispitanika (SRT je test procene sposobnosti verbalnog učenja i upamćivanja).

Ovim radom procenjivane su sledeće varijable: ukupna zastupljenost lezija (LL), srednju zastupljenost lezija (AL) u FA i AL MD, NAWM FA i NAWM MD u izabranim putevima bele mase: fascikulus arkuatus (AF), cingulum (CYN), korpus kalozum (CC), donji frontooccipitalni fascikulus (IFOF), donji longitudinalni fascikulus (ILF) i fascikulus uncinatus (UF) i rezultata dobijenih uz pomoć različitih NPT.

Za većinu neuropsiholoških testova najznačajnija korelacija je dokazana između LL i ispitivanih traktova BM (r vrednosti su u rasponu od -0,21 do -0,57, p vrednosti variraju od <0,00001 do 0,001), zatim sa NAWM FA (r vrednosti u rasponu od 0,32 do 0,53, p vrednosti od <0,00001 do 0,01) i NAWM MD (r u rasponu od -0,20 do -0,55, p vrednosti u rasponu od <0,00001 do 0,04), što je dominantno izraženo u AF, FOF, ILF, manje izraženo u CYN i UF.

Rezultati analize NPT su u poređenju sa AF, IFOF i ILF, pokazali srednji stepen povezanosti sa AL MD (r vrednosti u rasponu od -0,24 do -0,51, p vrednosti u rasponu od <0,00001 do 0,04).

Bitno je i napomenuti da ovim nije pronađena korelacija između svih ispitivanih MR i NST varijabli sa oštećenjem puta korpus kalozuma.

C. Uporedna analiza rezultata sa rezultatima iz literature

Multipla skleroza je heterogeno oboljenje koje zaokuplja pažnju naučnih istraživanja dugi niz godina. Tokom dugogodišnjeg istraživanja, bez obzira na osnovni patofiziološki mehanizam koji dovodi do MS, zaključeno je da je tok bolesti najčešće posledica dva osnovna klinička fenomena u čijim osnovama su procesi inflamacije i degeneracije (Confavreux i sar 2006). Sa jedne strane, to se odnosi na relapse akutne neurološke simptomatologije koji se završavaju parcijalnom ili kompletnom remisijom i sa druge strane na progresiju, koja predstavlja izraz konstantnog i ireverzibilnog pogoršanja kliničkog stanja pacijenta. Dalja istraživanja su pokazala da aksonski gubitak ("axonal loss") koji nastaje tokom akutne i rane faze bolesti može da bude difuzan i

delom nezavistan od zapaljenskog procesa (Kuhlmann i sar, 2002; De Stefano i sar, 2002; Filippi i sar, 2007). To je uslovalo postavljanje hipoteze o permanentnom funkcionalnom oštećenju CNS kod obolelih od MS kao posledici aksonskog oštećenja. Sve ovo je otvorilo i nekoliko problema u postavljanju definitivne dijagnoze MS-a korišćenjem sMR tehnika i njihove korelacije sa kliničkim statusom – termin koji se naziva kliničko - radiološki paradoks u MS (Barkhof 2002). Kliničko radiološki paradoks u MS odnosi se na korelaciju Proširene skale stepena kliničke onesposobljenosti (Expanded Disability Status Scale - EDSS, Kurtzke 1983) koji uključuje korelaciju Proširene skale stepena kliničke onesposobljenosti (EDSS) sa sMR nalazom, stepenom kognitivnog oštećenja, gubitkom aksona, stepenom moždane atrofije, kao i određivanjem stepena oštećenja moždanog parenhima koji okružuje jasne lezije parenhima i koji se naziva „naizgled normalna bela i siva masa“ - NNBm, NNSM (Miller DH i sar 2003, Ramió Torrentà L i sar, 2006, Filippi i sar, 2007). Upravo je ovaj paradoks predstavljao „nultu“ hipotezu za ovo istraživanje.

Kao potencijalna mera u prevazilaženju kliničko-radiološkog paradoksa ova studija je obuhvatala primenu nove statističke metode - random *forest* (RF) analiza. Ova metoda je korišćena u cilju procene da li i napredne MR tehnike mogu doprineti adekvatnoj klasifikaciji MS formi, kao što je to do sada postignuto primenom EDSS skora i procenom stepena kliničke onesposobljenosti, korišćenjem FS skala. Razlog koji je inicirao upotrebu novog statističkog pristupa su podaci prikazani brojnim prethodnim studijama i obuhvataju: nedostatak broja ispitanika, kao i ograničen broj podataka dobijen standardnim, a u novije vreme naprednim MR tehnikama.

Statistički posmatrano, u skladu s rezultatima ranijih MR studija (Bakshi i sar, 2008; Barkhof i sar, 2009), potvrđena je statistički značajna razlika između grupa za većinu posmatranih MR varijabli. Kao što se očekivalo, s obzirom na velik broj varijabli uključenih u analizu, "klasična" analiza je pokazala umereni stepen korelacije između kliničkog oštećenja baziranog na EDSS skor i strukturnih oštećenja mozga dobijenih uz pomoć nekoliko MR parametara. Slični rezultati dobijeni su poređenjem stepenovanja oštećenja baziranih na različitim FS, osim oštećenja senzornih funkcija, što nije bilo u skladu sa MR nalazima. Međutim, RF analiza pružila je nekoliko dodatnih važnih informacija dobijenih iz ovog seta podataka (Kačar i sar, 2011). Prvo, koristeći skup MR

kovarijabli, ovakav pristup je dao visoko preciznu mogućnost adekvatne klasifikacije kliničkog oštećenja prema EDSS i njihovu vrednost u različitim FS, sa relativno niskim stepenom greške. U celom uzorku pacijenata, RF analiza pokazala je izuzetno visoke performanse u identifikaciji pacijenata s oštećenjem piramidnih, senzornih funkcija, funkcija malog mozga i moždanog stabla (uz stepen greške ispod 10%), dok je imala najlošiju ulogu u definisanju smanjenja vrednosti vizuelnog i motornog sistema (sa stepenom greške od 91% i 70%). Ova nejednakost klasifikacije smatra se da je naverovatnije posledica nedovoljno standardizovanog stepenovanja oštećenja u različitim FS. Ovo razmatranje može se primeniti i na rezultatima dobijenih RF analizom različitih fenotipova MS. Shodno tome, ovi rezultati su se našli pod uticajem dihotomizacije koja je primenjena za dobijanje pouzdanih rezultata. Takav pristup je za rezultat imao i određeni stepen greške koji se ne može adekvatno oceniti a najbolje se vidi na primeru kada se posmatra samo stepen kliničkog oštećenja u poređenju bez oštećenja (npr. BMS i EDSS, gde su svi pacijenti imali EDSS ispod 3,0 ili poređenje ambulation indeksa i piramidalnih funkcija kod SPMS i PPMS pacijenata, gde su svi bolesnici imali kliničko oštećenje).

U ovoj studiji istraživana je i topografska distribucija oštećenja bele mase, korišćenjem analize naprednih MRI tehnika baziranim na difuzionoj traktografiji na velikoj kohorti MS bolesnika. Korišćeni su MD i FA, kao pokazatelji patološkog supstrata (Pierpaoli i sar, 2001; Song i sar, 2003). Brojni radovi ukazuju da je potreban oprez u tumačenju svih DT parametara kao mera „in vivo“ oštećenja. Prvo, u većini posmatranih oboljenja, aksonska i mijelinska oštećenja će se pojaviti istovremeno. Drugo, većina DT parametarskih vrednosti nisu konstantne tokom vremena, nego imaju tendenciju da se razlikuju, kako u akutnoj fazi, tako i prema patološkom supstratu tj. da li je u pitanju primarno oštećenje mijelina i/ili aksona. U skladu s rezultatima ranijih studija (Gallo i sar, 2005; Henry i sar, 2009; Raz i sar, 2010a), i ova studija je potvrdila da se upotrebom DT MR analize mogu detektovati patološke promene u ranim fazama MS, čak i kod CIS pacijenata, kada se govori o dominantnoj MD abnormalnost, bez izmene FA vrednosti (Precioza i sar, 2011, Kačar i sar, 2011). Međutim, to se ne slaže u potpunosti sa rezultatima istraživanja koje su sproveli Raz i sar (2010a) i koja ukazuje na difuzne izmene FA vrednosti kod CIS pacijenata. Razlog ovom neslaganju može biti primena

različitih analitičkih metoda, kao i kliničke karakteristike ispitivanih pacijenata. Takođe je bitno napomenuti da je, kod 97% ispitanih CIS pacijenata, definitivna MS dijagnoza postavljena nakon godinu dana (Raz i sar, 2010b), što je znatno veći procenat u odnosu na studiju Miller i sar (2005) i sugerise da su u ispitivanje uključeni bili pacijenti sa visokim rizikom za brzu evoluciju bolesti. Nasuprot ovim rezultatima, rezultati ove studije su u skladu s studijom koja je pokazala da CIS bolesnici sa dominantnom motornom simptomatologijom imaju značajane MD, ali ne i FA abnormalnosti u CST (Pagani i sar, 2005, 2009). Ovo sugerise da se MD abnormalnosti karakteristične za ranu fazu bolesti, ali da nužno ne moraju biti povezani sa FA promenama. Imajući u vidu da FA predstavlja meru strukturnog integriteta, ostaje otvorena prepostavka da je uprkos difuznim tkivnim abnormalnostima, koherentnost vlakana BM očuvana kod CIS pacijenata. U skladu s prethodnim studijama (Ceccarelli i sar, 2009; 2010; Rocca i sar, 2010.), analiza oštećenja i distribucije lezija kod PPMS bolesnika pokazuje difuzne MD abnormalnosti, dok je FA oštećenje prisutno samo kod pojedinih analiziranih BM puteva. U ovom ispitivanju je, u poređenju sa kontrolnom grupom, kod PPMS pacijenata je dokazano značajno povećanje MD vrednosti u svim analiziranim BM putevima, dok smanjena FA vrednosti nije bila karakteristična za puteve cinguluma obostrano, MCP, SCP i uncinatni fascikulus, što je najverovatnije posledica inflamatornih procesa za koje je karakteristično da se javljaju u ovom kliničkom MS podtipu (Lassmann i sar, 2007). Jedan od veoma bitnih rezultata je i odnos između FA i T2 L. Ova analiza je pokazala da, u poređenju sa BMS, SPMS pacijenti imaju FA abnormalnosti koje se protežu duž svih analiziranih BM puteva koji su obuhvatali lezije (naročito CST i CC), što upućuje na podatak da Walerianova degeneracija može biti jedan od glavnih patoloških supstrata tih abnormalnosti. Takođe je veoma bitan podatak o izraženim FA abnormalnostima cerebelarnih pedunkula koji nisu bili u skladu sa fokalnim lezijama kod SPMS u odnosu na BMS pacijente. Ovaj nalaz ukazuje, što potvrđuju i prethodna ispitivanja, da je atrofija cerebelarne sive mase glavni faktor različitosti između ove dve grupe ispitanika.

Uzimajući u obzir navedene razlike između SPMS i BMS, oštećenja malog mozga i CST mogu doprineti da objasne oštećenja lokomotornog sistema u SPMS (koja veoma često završavaju potpunom invalidnošću), dok difuzna oštećenja CC i asocijativnih puteva mogu objasniti izraženu stopu kognitivnih disfunkcija. Rezultati poređenja u

grupama između SPMS i PPMS pokazuju neslaganje između razlike u distribuciji lezija i oštećenja puteva bele mase. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima iz ranijih studija (Vrenken i sur, 2010; Riccitelli i sar, 2011) i potvrđuju tvrdnje da kod ovih podtipova različiti patološki mehanizmi mogu usloviti progresiju. Konkretno gledano, poznata je pretpostavka da se Walerijanova aksonska degeneracija manifestuje jasnim makroskopskim lezijama i igra važnu ulogu kod SPMS pacijenata, dok kod PPMS to nije slučaj. Kao što je i ranije pomenuto, patološke procese kod PPMS karakteriše umeren zapaljenski proces koji se događa u NAWM, nizak nivo fokalne demijelinacije plakova lokalizovanih u BM (Kutzelnigg i sar, 2005) i kompletnije faze remijelinacije (Bramow i sar, 2010). U zaključku može se reći da je ovakav način analiziranja podataka veoma bitan za procenu regionalne distribucije oštećenja tkiva sa potencijalnom ulogom u cilju boljeg razumevanja kliničke heterogenosti u multiploj sklerozi, čime se najbolji način može ispiti evolucija oštećenja puteva bele mase, njen odnos prema funkcionalnoj moždanoj reorganizaciji i proceni stepena invaliditeta.

D. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo teze

- 1) Kacar K, Rocca MA, Copetti M et al. Overcoming the Clinical--MR Imaging Paradox of Multiple Sclerosis: MR Imaging Data Assessed with a Random Forest Approach. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2011 Dec;32(11):2098-102. Epub 2011 Nov 11.
- 2) Preziosa P, Rocca MA, Mesaros S, Kacar K et al. Intrinsic damage to the major white matter tracts in patients with different clinical phenotypes of multiple sclerosis: a voxelwise diffusion-tensor MR study. *Radiology* 2011; 260: 541-550

E. Naučni doprinos disertacije

Ovakav vid istraživanja, koji obuhvata analizu standardnih i naprednih MR tehnika i njihovu korelaciju sa kliničkim i NPS testiranjem, prema najnovijim radovima

iz svetske literature je redak pristup u prevazilaženju kliničko-radiološkog paradoksa kod obolelih od multiple skleroze, naročito ako se uzme u obzir ukupan broj ispitanika i kliničkih podtipova pacijenata obolelih od multiple skleroze. Ovim radom posebna pažnja se pridaje difuzionoj traktografiji čiji je cilj prikazivanje prostiranja nervnih puteva, što je za sada, jedini mogući prikaz potencijalne patologije bele mase *in vivo*. Ranija istraživanja bila su bazirana na prikaze prostiranja pojedinačnih nervnih puteva i njihovu korelaciju sa najučestalijim MS podtipovima. Međutim, do sada nijedan rad, nije obuhvatao korelaciju sigurnih i potencijanih puteva prostiranja BM sa svim kliničkim MS podtipovima.

Istraživanje u ovoj studiji je obuhvatalo i korišćenje novih statističkih metoda, kao što je *forest* analiza, u cilju potencijalne uloge naprednih MR metoda za adekvatnu klasifikaciju MS podtipova, bez obzira na EDSS skor i stepen kliničke onesposobljenosti. Ono što je takođe bitno jeste pokušaj da se napredne MR tehnike iskoriste kao „mera“ potencijalne procene kognitivnog oštećenja. Imajući u vidu dugogodišnja istraživanja ove vrste oštećenja, značajno je bilo napraviti pomak ne samo u proceni stepena oštećenja kognitivnih funkcija, već i poređenja koja grupa MS pacijenata je sklonija razvoju kognitivnih oštećenja. Na taj način se analiziralo i kod kojih pacijenata sa kognitivnim oštećenjima dominira proces neurodegeneracije i u sklopu sa tim i nepovoljniji klinički tok. Takođe, ova studija poredi stepen regionalne i globalne atrofije, kao i različit stepen neurološkog i kognitivnog oštećenja kod bolesnika sa MS različitim fenotipovima, koji su međusobno upareni prema osnovnim demografskim karakteristikama, u cilju da razlike: u stepenu atrofije, oštećenja različitih funkcionalnih sistema i MR nalaza, doprinesu razumevanja mehanizma nastanka fizičke onesposobljenosti i kognitivnog oštećenja. Ovaj rad bi trebalo da doprinese prevazilaženju odsustva jasne korelacije izmedju kliničkog statusa bolesnika od MS, uključujući i kognitivni, i nalaza MR mozga. Uprkos brojnim studijama, ostalo je do sada nerazjašnjeno koji parametar MR najbolje korelira sa kliničkim i kognitivnim poremećajima u ovoj bolesti, i da li regionalno pre nego globalno oštećenje CNS ima ključnu ulogu u određivanju onesposobljenosti u MS. Ova studija uključuje primenu konvencionalnih MR tehnika i nedavno unapredjenih kvantitativnih tehnika MR (uključujući DT traktografiju), koje mogu da diferenciraju heterogeni

patološki supstrat u MS, radi analize vrste i stepena anatomskih poremećaja u različitim regionima CNS.

U ovoj studiji preseka, podaci dobijeni brojnim tehnikama konvencionalne i kvantitativne MR mozga kod velike grupe bolesnika od MS, koja uključuje sve kliničke fenotipove bolesti, će se koristiti da se na najsveobuhvatniji način proceni korelacija između kliničkih i kognitivnih poremećaja sa zahvaćenošću specifičnih struktura CNS u različitim stadijumima ove bolesti.

MIŠLJENJE I PREDLOG

Na osnovu svega navedenog, Komisija sa zadovoljstvom konstatuje da je kandidat Dr Katarina Kačar, pratila predloženu metodologiju rada i kompleksan plan istraživanja na jasno definisanoj i velikoj grupi ispitanika. Radi se o originalnom istraživanju, koje prevazilazi standardne okvire naših akademskih istraživanja, sa posebnim osvrtom na korišćenje naprednih MR tehnika, kao i novih statističkih metoda, što je od veoma bitne važnosti za razumevanje, ne samo patofizioloških mehanizama multiple skleroze, već i mogućnosti predikcije kognitivnih oštećenja.

U Beogradu, 05.02.2012.godine

ČLANOVI KOMISIJE:

Mentor: Prof dr Tatjana Stošić-Opinčal

Akademik dr Vladimir S. Kostić

Komentori:

Prof dr Jelena Drulović

Prof dr Duško Kozić

Prof dr Massimo Filippi

Prof dr Đorđije Šaranović