

## STRESZCZENIE

### Rozprawa doktorska oparta o cykl publikacji.

Stwardnienie rozsiane (ang. multiple sclerosis, MS) jest przewlekłą chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o podłożu immunologicznym, powodującą zmiany demielinizacyjne oraz aksonopatię. MS rozpoczyna się zwykle w młodym wieku, z dominacją u kobiet i często prowadzi do istotnej niepełnosprawności. Rozróżnia się cztery typy MS, z których postać rzutowo-remisyjna występuje najczęściej. Klasyczne obrazowanie strukturalne metodą rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance, MR) odgrywa istotną rolę w postawieniu rozpoznania, diagnostyce różnicowej oraz w monitorowaniu przebiegu stwardnienia rozsianego. W leczeniu tego schorzenia stosuje się terapię immunomodulującą celem opóźnienia progresji choroby. Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) należy do najczęściej stosowanych środków pierwszej linii leczenia MS.

W neuroradiologii oprócz obrazowania strukturalnego używane są również tzw. zaawansowane techniki obrazowania obejmujące m. in. obrazowanie zależne od dyfuzji (ang. diffusion-weighted imaging, DWI) oraz spektroskopię rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance spectroscopy, MRS).

Sekwencja DWI oparta jest na analizie termicznie zależnych ruchów cząsteczek wody (ruchy Browna) w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co pozwala na zbadanie zmian patologicznych na poziomie niemalże komórkowym, niewidocznych w konwencjonalnym badaniu MR. Jednym z parametrów obliczanych na podstawie obrazowania dyfuzyjnego jest rzeczywisty współczynnik dyfuzji (ang. apparent diffusion coefficient, ADC) – matematycznie wyliczona wartość określająca dyfuzję zobrazowaną w badaniu MR. Obniżona wartość współczynnika ADC świadczy o utrudnionej dyfuzji, podwyższona – o ułatwionej dyfuzji.

Badanie MRS umożliwia zobrazowanie zmian metabolicznych w mózgowiu. Metoda ta wykorzystuje właściwości protonów wodoru wchodzących w skład większości związków chemicznych w organizmie człowieka, co pozwala na bezpośrednie określenie występowania związków chemicznych powstałych w wyniku procesów metabolicznych w tkankach prawidłowych i patologicznych *in vivo*. Wynik badania przedstawiany jest w postaci widma spektroskopowego oraz stosunków stężeń metabolitów. W prawidłowym mózgowiu dominuje N-acetylo-asparaginian (ang. N-acetyl aspartate, NAA), uznawany za marker aktywności/liczby neuronów, ponadto ocenia się cholinę (ang. choline, Cho), będącą markerem

wzmoczonej syntezy lub degradacji błon komórkowych, oraz mioinozytol (ang. myo-Inositol, mI), uważany za marker gleju astrocytarnego. Powyższe metabolity odnosi się do kreatyny (ang. creatine, Cr), metabolitu zaangażowanego w procesy energetyczne komórki, której stężenie w tkankach mózgowia jest względnie stałe, uzyskując następujące stosunki metabolitów: NAA/Cr, Cho/Cr oraz mI/Cr.

Projekt 1. miał na celu wykrycie zaburzeń dyfuzji pod postacią ułatwienia dyfuzji (wzrost wartości współczynnika ADC) w istocie białej i szarej prawidłowo wyglądającej (ang. normal appearing white and grey matter, NAWM, NAGM) u pacjentów z MS w porównaniu z grupą kontrolną (ang. control group, CG) i pacjentami z innymi ogniskami hiperintensywnymi (ang. white matter hyperintensities, WMHs) oraz zastosowanie pomiarów zaburzeń dyfuzji w diagnostyce różnicowej powyższych stanów. Pomiar współczynnika ADC został wykonany u pacjentów z rozpoznaniem stwardnieniem rozsianym przed podjęciem leczenia IFN- $\beta$  (pacjenci natywni).

Projekt 2. Pomiar współczynnika ADC został wykonany w badaniu wyjściowym przed rozpoczęciem leczenia IFN- $\beta$  (grupa MS0) oraz po roku od rozpoczęcia leczenia (grupa MS1) u pacjentów z rozpoznaną postacią rzutowo-remisyjną stwardnienia rozsianego. Wartość współczynnika ADC oraz pozostałe dane demograficzne, kliniczne i radiologiczne zostały użyte w modelach predykcyjnych dotyczących słabej odpowiedzi na leczenie definiowanej jako brak NEDA (ang. no evidence of disease activity) w obserwacji 3-letniej od momentu rozpoczęcia leczenia.

Projekt 3. zakładał wykrycie zaburzeń metabolicznych u pacjentów z rozpoznaną postacią remisyjno-rzutową MS w badaniu MRS wykonanym po 1 roku leczenia w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych ochotników oraz ocenę zmian stosunków metabolitów po 2 latach terapii IFN- $\beta$  celem oceny przydatności badania MRS w monitorowaniu skuteczności leczenia. Ponadto oceniono przydatność stosunków metabolitów z wyjściowego badania MRS razem z danymi demograficznymi, klinicznymi i pozostałymi danymi radiologicznymi w modelach predykcyjnych dotyczących słabej odpowiedzi na leczenie definiowanej jako brak NEDA w obserwacji 3-letniej od momentu rozpoczęcia leczenia.

Cele te zrealizowano poprzez przeprowadzenie trzech projektów badawczych, z których każdy stanowił podstawę dla artykułu współtworzącego cykl [1,2,3].

W ramach pierwszego projektu badawczego ocenie poddano badanie MR mózgowia 66 pacjentów z MS nieleczonych do tej pory lekami immunomodulującymi, 66 pacjentów ze zmianami hiperintensywnymi w istocie białej (WMHs) oraz 64 osoby z grupy kontrolnej (CG). Badanie MR przeprowadzono za pomocą aparatu 1,5 T. Pomiar współczynnika ADC został wykonany w 13 lokalizacjach z użyciem obszaru zainteresowania (ang. region of interest, ROI) wielkości ok. 200 mm<sup>2</sup> – w istocie białej prawidłowo wyglądającej (NAWM) mózdzku, mostu, w okolicach czołowych, czołowo-ciemieniowych i skroniowych oraz w istocie szarej prawidłowo wyglądającej (NAGM) wzgórz i głowy obu jąder ogoniastych.

Średnia wartość współczynnika ADC w obu okolicach czołowych, czołowo-ciemieniowych i skroniowych (ROIs 8-13) była istotnie statystycznie wyższa w grupie MS w porównaniu do grupy WMHs i CG ( $p < 0.001$ ), natomiast wartość ADC w moście (ROI 3) u była wyższa u pacjentów z MS w porównaniu z grupą kontrolną ( $p < 0.05$ ). Analiza krzywych ROC dla pomiarów współczynnika ADC w powyższych lokalizacjach (ROI 8-13) w różnicowaniu z innymi ogniskami hiperintensywnymi (WMHs) wykazała dokładność testu między 0,70 a 0,77.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonego badania sugerują, że pomiar współczynnika ADC w NAWM u pacjentów z MS może wspierać diagnostykę różnicową z innymi stanami przebiegającymi z obecnością ognisk hiperintensywnych w istocie białej (WMHs).

Do projektu drugiego zakwalifikowano 87 pacjentów z rozpoznaną postacią rzutowo-remisyjną MS (n=87), których podzielono na dwie grupy, w zależności od czasu przeprowadzenia pierwszego badania MR mózgowia z sekwencją DWI: grupa MS0 (n=45) – pacjenci z badaniem MR przed rozpoczęciem terapii IFN- $\beta$ , grupa MS1 (n=42) pacjenci z „wyjściowym” badaniem MR wykonanym po 1 roku leczenia. U wszystkich pacjentów dokonano pomiarów współczynnika ADC w 13 lokalizacjach dla NAWM i NAGM (jak w projekcie 1.) W grupie MS0 pacjenci osiągnęli dobrą odpowiedź na leczenie określoną za pomocą NEDA w 64.4%, 46.5% i 33.3% odpowiednio po 1, 2 i 3 roku leczenia. Natomiast pacjenci z grupy MS1 wykazali NEDA w 71.4% i 48.7% odpowiednio dla przedziałów czasowych 1-2 rok i 1-3 rok leczenia. Wyższa wartość współczynnika ADC w NAWM wiązała się z utratą NEDA oraz jej klinicznego i radiologicznego komponentu z ok. 1-3% wzrostem ryzyka gorszej odpowiedzi na leczenie w obu grupach ( $p = 0.0001 - 0.0489$ ).

Wartość współczynnika ADC wydaje się stanowić dodatkowy czynnik prognostyczny w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie wg NEDA.

Do trzeciego projektu zakwalifikowano 41 pacjentów z rzutowo-remisyjnym przebiegiem MS, leczonych IFN- $\beta$  oraz 41 odpowiednio dobranych pod względem płci i wieku osób zdrowych (CG). U każdego uczestnika projektu wykonano badanie MR mózgowia z techniką spektroskopii rezonansu magnetycznego (MRS) aparatem 1,5 T – badanie MRS przeprowadzono techniką pojedynczego woksela (ang. single voxel spectroscopy, SVS), z użyciem woksela wielkości 2 x 2 x 2 cm, który był lokalizowany w prawidłowo wyglądającej w sekwencjach konwencjonalnych korze tylnej części zakrętu obręczy (ang. posterior cingulate gyrus, PCG).

Pacjenci z MS w badaniu wyjściowym MR wykonanym po 1 roku leczenia IFN- $\beta$  wykazali istotne statystycznie obniżenie stosunku metabolitów NAA/Cr ( $p < 0.0001$ ) oraz podwyższenie Cho/Cr ( $p = 0.016$ ) w PCG z porównaniem z grupą kontrolną. Żaden z wyjściowych parametrów metabolicznych nie był powiązany z prognozowaniem odpowiedzi na leczenie określaną za pomocą NEDA. W aspekcie monitorowania skutków leczenia jedynie kombinacja poprawy w zakresie stosunku metabolitów NAA/Cr oraz Cho/Cr między 1 a 2 rokiem leczenia była powiązana z ok. 6,3-krotną szansą jednocześnie występującego braku aktywności choroby czyli uzyskania przez pacjenta NEDA.

Obrazowanie dyfuzyjne wydaje się obiecującą techniką neuroobrazowania, która mogłaby dostarczać dodatkowych ilościowych danych wspomagających m.in. diagnostykę różnicową między pacjentami z MS a innymi, bardzo częstymi zmianami hiperintensywnymi w istocie białej o innym charakterze (WMHs), jak również wydaje się przydatnym narzędziem w stratyfikacji ryzyka gorszej odpowiedzi na leczenie IFN- $\beta$ . Technika spektroskopii rezonansu magnetycznego pozwala na określenie zmian metabolicznych mózgowia u pacjentów z MS w prawidłowo wyglądającej korze tylnej części zakrętu obręczy, co przemawia za zajęciem przez proces patologiczny również istoty szarej. Ocena metabolitów w tej lokalizacji wydaje się użyteczna w monitorowaniu skutków leczenia immunomodulującego.

#### **Publikacje wchodzące w skład cyklu:**

1. Zacharzewska-Gondek A, Pokryszko-Dragan A, Gondek TM, Kołtowska A, Gruszka E, Budrewicz S, Sasiadek M, Bładowska J. Apparent diffusion coefficient measurements in normal appearing white matter may support the differential diagnosis between multiple sclerosis lesions and other white matter hyperintensities. J Neurol Sci. 2019 Feb 15;397:24-30.

doi: 10.1016/j.jns.2018.12.018.

(IF 3.115, Pkt. MNiSW: 70)

2. Zacharzewska-Gondek A, Pokryszko-Dragan A, Budrewicz S, Sasiadek M, Trybek G, Bladowska J. The role of ADC values within the normal-appearing brain in the prognosis of multiple sclerosis activity during interferon- $\beta$  therapy in the 3-year follow-up: a preliminary report. *Sci Rep.* 2020 Jul 30;10(1):12828.

doi: 10.1038/s41598-020-69383-3.

(IF 3.998, Pkt. MNiSW: 140)

3. Zacharzewska-Gondek A, Pokryszko-Dragan A, Sasiadek M, Zimny A, Bladowska J. Magnetic resonance spectroscopy of the normal appearing grey matter in the posterior cingulate gyrus in the prognosis and monitoring of disease activity in MS patients treated with interferon- $\beta$  in a 3-year follow-up. *J Clin Neurosci.* 2020 Sep 79;205-214.

doi: 10.1016/j.jocn.2020.07.045

(IF 1.760, Pkt. MNiSW: 70)

**IF: 8.873**

**Pkt. MNiSW: 280**

## ABSTRACT

### **Doctoral thesis based on a series of publications.**

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory disease that causes demyelination, inflammation, gliosis and neuronal loss in the central nervous system (CNS), affecting most frequently young people, with a predominance in women. It is an important social problem as it leads to significant disability. There are four types of clinical course of the disease, among which relapsing-remitting one is the most common. The diagnosis of MS is made on the basis of clinical manifestations and results of imaging and laboratory findings. Magnetic resonance imaging (MRI) is one of the paraclinical tools included in the current McDonald diagnostic criteria, which supports confirmation of the diagnosis of MS and allows the follow-up of the course of the disease. Immunomodulatory therapy is applied to reduce activity and to delay the progression of this disease, interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) is most frequently used.

Apart from structural imaging there are a few advanced imaging techniques i.a. diffusion-weighted imaging (DWI) and magnetic resonance spectroscopy (MRS), which allow for greater insight into the processes occurring in the CNS.

DWI is a technique based on the random movements of the water molecules in extracellular space which provides an assessment of tissue integrity. Measurements of a mathematically calculated diffusion coefficient (apparent diffusion coefficient, ADC) allow detection of changes in the overall diffusion of water molecules irrespective of the direction of motion. Even subtle pathological impairment which disturbs the tissue architecture may result in a facilitated mobility of water molecules and consequently in increased values of ADC. On the contrary, decline of extracellular space leads to the restriction of diffusion and decreased values of ADC.

Magnetic resonance spectroscopy (MRS) provides unique information about the metabolism of normal and pathological tissues *in vivo* such as a reduction of N-acetyl aspartate (NAA) concentration, which contributes to neuronal damage/dysfunction, increase in choline-containing compounds (Cho) as a marker of myelin damage/repair, increased concentration of myo-Inositol (mI), which is associated with astrogliosis and tissue repair as well as others such as glutamate, lipids, and lactates. Results of MRS are depicted as a spectrum with peaks of metabolites as well as metabolite ratios in comparison with creatine (Cr), which concentration in brain tissue is relatively constant.

The aim of project 1 was to assess the usefulness of ADC measurements within normal-appearing white and deep grey matter (NAWM, NAGM) in the differential diagnosis between patients with white matter hyperintensities in the course of MS and other entities (WMHs). Measurement of apparent diffusion coefficient (ADC) was obtained from the baseline MR scan of MS patients before beginning of IFN- $\beta$  treatment (naïve patients) and it was compared with the control group (CG) as well as with the group of patients with other white matter hyperintensities (WMHs).

Project 2. ADC measurements were performed in MS patients with relapsing-remitting course of disease, divided into two groups according to the timing of the initial MRI:

- MS0 group - 1<sup>st</sup> MRI before starting treatment = true baseline MRI;
- MS1 group - 1<sup>st</sup> MRI after 1 year of treatment with IFN- $\beta$  and no available previous MRI scans = on-treatment MRI as baseline.

ADC values, conventional MRI findings, demographic and clinical factors were assessed as potential prognostic factors of treatment response based on NEDA status (no evidence of disease activity) within the following 3 years.

Project 3. The purpose of the study was to determine the metabolic alterations within normal-appearing grey matter in the posterior cingulate gyrus region (PCG) using MRS in patients with multiple sclerosis after the first and second year of IFN- $\beta$  treatment, to assess the value of those on-treatment metabolic derangements in prediction of no evidence of disease activity (NEDA) in subsequent years of therapy, as well as to check the usefulness of these measurements in monitoring treatment response in the NEDA context in a parallel period of time.

With regard to the aims, three research projects were conducted, each being the basis for one of the publications included in the series [1,2,3].

In the first study, 66 patients with MS before treatment, 66 patients with WMHs and 64 control subjects (CG) underwent MRI examination including diffusion-weighted imaging with a 1.5 T MR unit. ADC measurements were obtained from NAWM of the cerebellum, pons as well as frontal, fronto-parietal and temporal regions bilaterally, and from NAGM of thalami and heads of caudate nuclei, using round region of interest (ROI) sized 200mm<sup>2</sup>. The mean ADC values in frontal, fronto-parietal and temporal NAWM were significantly higher in the

MS group than in subjects with WMHs and CG ( $p < 0.001$ ), whereas the mean ADC value in pons was higher in MS than in CG ( $p < 0.05$ ). All ROC curves obtained from ROIs: 8, 9, 10, 11, 12 and 13 demonstrated good diagnostic accuracy in differentiation between MS and WMHs patients with the area under the curve from 0.70 to 0.77.

The results seem to suggest that ADC measurements may support the differential diagnosis between MS and other conditions associated with white matter hyperintensities, especially in the inconclusive cases.

In the next project 87 MS patients treated with IFN- $\beta$  were included in the study, ADC values were calculated for 13 regions of normal-appearing white and grey matter (NAWM, NAGM) based on MRI performed with a 1.5 T magnet before (MS0,  $n=45$ ) or after one year of therapy (MS1,  $n=42$ ). NEDA rates in the MS0 group were 64.4%, 46.5% and 33.3% after the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> year of treatment, respectively and in MS1 patients 71.4% and 48.7% for the periods 1<sup>st</sup>-2<sup>nd</sup> and 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> years of treatment, respectively. ADC values in the NAWM regions contributed to loss of NEDA and its clinical and radiological components, with a 1-3% increase in the risk (OR and HR) of NEDA loss ( $p=0.0001-0.0489$ ) in both groups.

The results may imply, that ADC measurements may have an additional prognostic value with regard to NEDA status.

In the third experiment, 41 relapsing-remitting MS patients and 41 sex- and age-matched healthy subjects underwent routine MRI protocol with additional MRS sequence with the use of a 1.5 T magnet. A single voxel size of 2 x 2 x 2 cm was inserted in the cortex of the posterior cingulate gyrus (PCG) region. MS patients in the initial scan showed a statistically significant decline in NAA/Cr ratio ( $p < 0.0001$ ) and an increase in Cho/Cr ratio ( $p=0.016$ ) compared to the control group. None of the MRS parameters predicted NEDA maintenance or the time to loss of NEDA. In treatment monitoring only an improvement in the combination of NAA/Cr + Cho/Cr ratio between the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> year of treatment was connected with a 6.27-fold chance ( $p=0.025$ ) of having simultaneous NEDA maintenance.

To conclude, metabolite alterations in the PCG region did not predict NEDA maintenance, but they seem to be useful in treatment monitoring.

Diffusion-weighted imaging appear to be a promising neuroimaging technique, which may provide additional quantitative data supporting i.a. differential diagnosis between MS lesions and other white matter hyperintensities as well as it may be a useful tool in prognosis



of a poor response to the IFN- $\beta$  treatment. Magnetic resonance spectroscopy can show metabolic alterations within the normal-appearing cortex in the posterior cingulate gyrus, which are not visible on conventional MRI in patients with MS. The assessment of metabolite ratios in this location seem to be helpful in IFN- $\beta$  treatment monitoring.

The publications included in the series:

1. Zacharzewska-Gondek A, Pokryszko-Dragan A, Gondek TM, Kołtowska A, Gruszka E, Budrewicz S, Sasiadek M, Bładowska J. Apparent diffusion coefficient measurements in normal appearing white matter may support the differential diagnosis between multiple sclerosis lesions and other white matter hyperintensities. *J Neurol Sci.* 2019 Feb 15;397:24-30.  
doi: 10.1016/j.jns.2018.12.018.  
(IF 3.115, MNiSW points: 70)
2. Zacharzewska-Gondek A, Pokryszko-Dragan A, Budrewicz S, Sasiadek M, Trybek G, Bładowska J. The role of ADC values within the normal-appearing brain in the prognosis of multiple sclerosis activity during interferon- $\beta$  therapy in the 3-year follow-up: a preliminary report. *Sci Rep.* 2020 Jul 30;10(1):12828.  
doi: 10.1038/s41598-020-69383-3.  
(IF 3.998, MNiSW points: 140)
3. Zacharzewska-Gondek A, Pokryszko-Dragan A, Sasiadek M, Zimny A, Bładowska J. Magnetic resonance spectroscopy of the normal appearing grey matter in the posterior cingulate gyrus in the prognosis and monitoring of disease activity in MS patients treated with interferon- $\beta$  in a 3-year follow-up. *J Clin Neurosci.* 2020 Sep 79;205-214.  
doi: 10.1016/j.jocn.2020.07.045  
(IF 1.760, MNiSW points: 70)

**IF: 8.873**

**MNiSW points: 280**