

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Neurovědy



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Jana Mašková

Role akumulace železa a dalších kovů v patofyziologii neurodegenerativních onemocnění

**The role of accumulation of iron and other metals in the pathophysiology of
neurodegenerative diseases**

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: MUDr. Petr Dušek, Ph.D.

Konzultant: prof. MUDr. David Školoudík, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30.4.2020

Jana Mašková

Identifikační záznam:

MAŠKOVÁ, Jana. *Role akumulace železa s dalších kovů v patofyziologii neurodegenerativních onemocnění. [The role of accumulation of iron and other metals in the pathophysiology of neurodegenerative diseases]*. Praha, 2020. Počet stran 144. Dizertační práce (Ph.D.). Neurologická klinika a Centrum klinických neurověd, 1.lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Všeobecná fakultní nemocnice. Školitel: MUDr. Petr Dušek, Ph.D.

Poděkování:

Děkuji za podporu a vedení mému školiteli Petrovi Duškovi, který mě celou dobu studia držel na správné cestě. Profesoru Davidu Školoudíkovi za předání zkušeností s transkraniální sonografií, inspiraci a ochotu diskutovat možnosti jejího dalšího využití. Díky patří profesorovi Evženu Růžičkovi, který mi dal příležitost rozvíjet můj zájem o neurologii.

Za trpělivost a pomoc s dokončením práce velice děkuji Jiřímu Klempířovi, Marku Nyklovi a všem kolegům, kteří si našli čas, aby přispěli svými nápady a připomínkami.

Abstrakt

Vliv kumulace kovů v patofyziologii neurodegenerativních onemocnění je dlouhodobě diskutovaným tématem zejména kvůli možnosti ovlivnění pomocí chelátů. Ačkoliv mechanismy neurodegenerace jsou dobře prozkoumané, role kovů v nich je stále nejasná. Hlavním úskalím je omezená vyšetřitelnost koncentrace kovů v CNS in vivo. Nejdostupnější neinvazivní metodou je magnetická rezonance (MR). Naším cílem bylo posouzení možností užití transkraniální sonografie (TCS) v diagnostice neurodegenerativních onemocnění a bližší zkoumání podkladu echogenity.

V první studii jsme pomocí fúze TCS se snímky MR ověřili přesnou lokalizaci běžně hodnocených struktur (zejména substantia nigra a nucleus lentiformis) a zaměřili se na přítomnost ložiskových strukturálních změn potenciálně ovlivňujících TCS nálezy u Wilsonovy nemoci (WN) a Parkinsonovy nemoci (PN). Získané snímky MR byly použity i k semikvantitativnímu porovnání s TCS. Ačkoliv se potvrdila vysoká přínosnost TCS v diferenciální diagnostice WN a měla by se stát běžným screeningovým vyšetřením extrapyramidových pacientů s atypickým obrazem, zjevnou vazbu na depozita kovů se nepodařilo prokázat. Druhá studie využila získaných výsledků fúze k navržení měření echogenity další mozkové struktury – inzulární oblasti – pro diferenciální diagnostiku WN. V poslední studii jsme porovnávali TCS nálezy u idiopatické formy poruchy chování v REM spánku (iRBD) a synukleinopatií s projevy a bez projevů RBD. Hodnotili jsme korelaci s DAT-SPECT.

Dosud nebyl proveden dostatek fúzních studií, které by ozřejmily zvažovaný vliv kovů na echogenitu. Na základě našich výsledků předpokládáme, že změny na TCS odráží kovy indukované sekundární změny, s predilekcí k určitým oblastem: železo k SN a měď k nucleus lentiformis a insule. Kvůli jejich úzkým interakcím však není možné jejich roli v neurodegeneraci separovat.

Klíčová slova: neurodegenerace, transkraniální sonografie, substantia nigra, akumulace kovů, železo, měď, mangan, zinek, Wilsonova nemoc, Parkinsonova nemoc

Summary

The role of metal accumulation in the pathophysiology of neurodegenerative diseases has been a hot topic in recent years due to the possibility of its treatment by chelating agents. Although the mechanisms of neurodegeneration are well known, the role of metal accumulation is still unclear. The main limitation are unsatisfactory methods for in vivo metal imaging; the most widely used technique is magnetic resonance imaging (MRI). Our aim was to assess the possibility of using transcranial sonography (TCS) in differential diagnosis of neurodegenerative diseases and to further explore the underlying factors of echogenicity.

In the first study, using TCS fusion with MRI, we focused on location verification of the commonly assessed structures (substantia nigra and nucleus lentiformis) and exclusion of possible focal structural changes affecting the echogenicity in WD and PD patients. Moreover, obtained MRI were used for semi-quantitative comparison with TCS images. Although TCS has been confirmed to be highly beneficial in differential diagnosis of Wilson's disease and it should be recommended as a screening method for extrapyramidal patients with atypical course of the disease, the direct relationship between TCS and metal deposits could not be proven. The obtained results from the ultrasound fusion imaging allowed the assessment of further structural changes and revealed hyperechogenicity of insula as another potential diagnostic marker of Wilson's disease. In the last study, we compared TCS findings in idiopathic REM sleep behavior disorder (iRBD) and synucleinopathy with and without RBD. We evaluated the correlation between TCS and SPECT.

Only few ultrasound imaging fusion studies have been published. Thus, we do not have enough data yet to evaluate the direct effect of metals on TCS. Nevertheless, based on our findings, we assume that TCS changes reflect metal-induced secondary changes, with predilection to certain areas: iron to SN and copper to nucleus lentiformis and insula. However, due to close interactions of metals, it is not possible to separate their role in neurodegeneration.

Key words: neurodegeneration, transcranial sonography, substantia nigra, metal accumulation, iron, copper, manganese, zinc, Wilson's disease, Parkinson's Disease

Obsah

1	Úvod	9
1.1	Neurodegenerace	9
1.1.1	Agregace proteinů	9
1.1.2	Oxidativní stres	10
1.1.3	Mitochondriální dysfunkce a poruchy energetického metabolismu	11
1.1.4	Poškození transportních funkcí	11
1.1.5	Zánětlivé změny	12
1.2	Neurodegenerativní onemocnění	13
1.2.1	Onemocnění s hromaděním beta-amyloidu	13
1.2.2	Tauopatie	14
1.2.3	Alfa-synukleinopatie	15
1.2.4	Polyglutaminová onemocnění	17
1.2.5	Metabolicky podmíněné neurodegenerace s akumulací kovů	18
1.3	Kovy v centrální nervovém systému	21
1.3.1	Železo	23
1.3.2	Měď	26
1.3.3	Mangan	28
1.3.4	Zinek	29
1.4	Role kovů ve fyziologickém stárnutí a v patofyziologických stavech	30
1.4.1	Parkinsonova nemoc	31
1.4.2	Wilsonova nemoc	32
1.4.3	Neurodegenerace s akumulací železa v mozku	33
1.4.4	Další neurodegenerativní onemocnění s akumulací kovů	34
1.5	Zobrazovací metody ke stanovení kovů v centrální nervové soustavě	35
1.5.1	Kvantitativní metody magnetické rezonance	40
1.5.2	Transkraniální sonografie	44
2	Cíle a hypotézy práce	56
3	Použitá metodika	57
3.1	Transkraniální sonografie	57
3.2	Fúze transkraniální sonografie a magnetické rezonance	59
4	Popisy jednotlivých studií	61
4.1	Studie I – Porovnání fúze transkraniální sonografie a magnetické rezonance u Wilsonovy nemoci a Parkinsonovy nemoci s časným počátkem	61
4.1.1	Úvod	61
4.1.2	Metodika	62
4.1.3	Výsledky	65

4.1.4	Diskuze.....	68
4.2	Studie II – Analýza digitalizovaného obrazu echogenity inzuly detekované TCS/MR fúzí u pacientů s Wilsonovou nemocí a Parkinsonovou nemocí s časným počátkem.....	72
4.2.1	Úvod.....	72
4.2.2	Metodika.....	72
4.2.3	Výsledky.....	75
4.2.4	Diskuze.....	77
4.3	Studie III – Srovnávací studie echogenity substantia nigra a SPECT s 123I-ioflupanem u pacientů se synukleinopatií s poruchou chování v REM spánku a bez ní	78
4.3.1	Úvod.....	78
4.3.2	Metodika.....	79
4.3.3	Výsledky.....	83
4.3.4	Diskuze.....	88
5	Závěry	93
6	Seznam zkratk.....	94
7	Literatura	95
	Příloha I – seznam publikací.....	114
	Příloha II – publikace in extenso	115

1 Úvod

1.1 Neurodegenerace

Neurodegenerace je souhrnným označením pro hereditární nebo sporadické choroby s postupným rozvojem klinických obtíží na podkladě úbytku specifických populací nervových buněk. Mechanismus, kterým k zániku buněk dochází se liší. Mezi **hlavní procesy neurodegenerace** patří konformační změny proteinů, oxidativní stres s formací reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), poruchy mitochondrií, poruchy energetického metabolismu nebo zánětlivé změny.(Jellinger 2010) Společným konečným výsledkem je spuštění kaskády vedoucí k buněčné smrti (apoptózy, nekrózy nebo ferroptózy, které jsou popsány dále v textu).(Galluzzi, Vitale et al. 2018) Klinický obraz je více závislý na místě postižení než na primárním mechanismu, který k němu vedl. Stejně populace mozkových buněk mohou být poškozovány několika odlišnými způsoby (např. v neurofibrilárních klubkách je obsažen jak α -synuklein [α S], tak fosforylovaný tau protein [τ protein]). Vyvolávající příčiny neurodegenerací mohou být genetická predispozice, vliv prostředí nebo endogenní změny podmíněné stárnutím.(Castillo, Castro-Obregon et al. 2019)

1.1.1 Agregace proteinů

Patologické shlukování proteinů podmiňuje vznik intracelulárních i extracelulárních depozit obsahujících nerozpustná vlákna. To vede nejen k narušení interakcí nejen mezi jednotlivými proteiny a buňkami, ale i k poškození synaptické plasticity a transmise. Za normálního stavu jsou proteiny, nově vzniklé v endoplazmatickém retikulu, skládány do funkční molekuly **chaperony**.(Buchner 2019) Jedná se o ligand nespecifické ATPázy, jejichž úkolem je kromě skládání proteinů do správného prostorového uspořádání, bránění jejich předčasné interakci s okolními strukturami a jejich precipitaci. Jsou schopny také opravy chybné struktury proteinu vzniklé v důsledku buněčného stresu. Mezi důležité chaperony patří např. „*heat shock proteiny*“ nebo ubiquitin, který hraje roli v patogenezi neurodegenerace.

Pokud dojde ke vzniku chybně sbaleného proteinu, bývá degradován intracelulárními proteázami nebo v lysozomech autofagií.(Lee 2009, Martinet, Agostinis et al. 2009) Dalším významným mechanismem zajišťujícím dohled nad buněčnými procesy je **ubiquitin-proteazomový systém**.(Amm, Sommer et al. 2014) substrátově specifický nelysozomální proteolytický komplex aktivovaný oxidativním stresem nebo buněčným poškozením. Jeho funkcí je kontrola genové exprese, buněčné signalizace nebo opravy DNA. Při selhání zmíněných kontrolních systémů buňky nebo při chronickém stresu endoplazmatického retikula, se proteiny shlukují do toxických struktur a indukují neurodegeneraci.

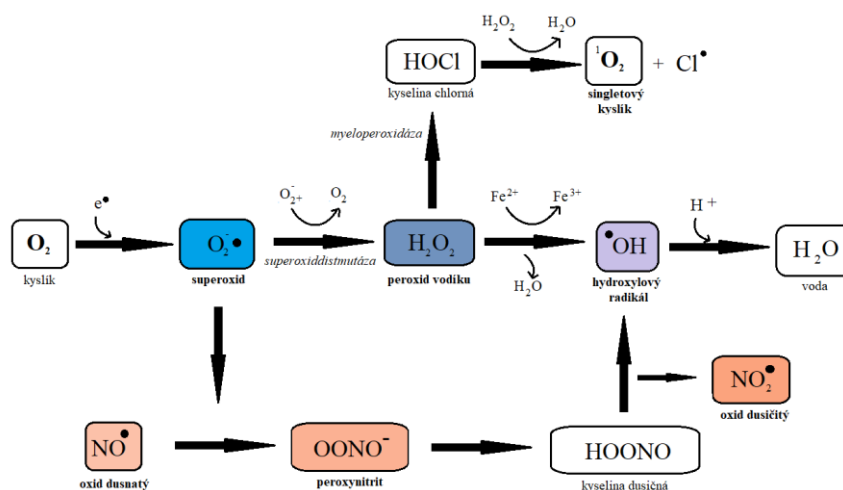
Mezi **proteiny spojované s neurodegenerací** patří beta-amyloid ($A\beta$), α S, τ -protein nebo priony. Mezi nejčastější nerozpustné konformace proteinů patří uspořádaný beta-skládaný list nebo neuspořádané amorfní shluky.(Ecroyd and Carver 2008) Bylo prokázáno, že existuje několik

odlišných podtypu A β , z nichž některé mají toxický efekt a jiné pouze vytváří oligomery bez škodlivého vlivu na jejich okolí.(Harmeier, Wozny et al. 2009) K „malignizaci“ depozit většinou přispívají další faktory. Negativním mediátorem je například APLP1 (*amyloid precursor like protein 1*)(Lauren, Gimbel et al. 2009) nebo apolipoprotein E ϵ 4(Gunzburg, Perugini et al. 2007). Naopak protektivní vliv mohou mít jednodoménové protilátky, které se specificky váží na malé oligomery A β , brání jim sekundárně hyperfosforylovat τ protein a inhibují formaci neurofibril, čímž brání vzniku neurotoxicity.(De Felice, Wu et al. 2008, Kellner, Matschke et al. 2009, Lafaye, Achour et al. 2009) Nerozpustné shluky α S jsou detekovány při post mortem vyšetření u pacientů a Parkinsonovou nemocí (PN)(Uversky 2007, Kazantsev and Kolchinsky 2008) nebo demencí s Lewyho tělísky (DLB).(Paleologou, Kragh et al. 2009) Jak u abnormálně konformovaného α -synukleinu, tak u τ -proteinu a jejich meziproductů se předpokládá schopnost šíření z buňky na buňku.(Clavaguera, Bolmont et al. 2009, Danzer, Krebs et al. 2009, Frost, Jacks et al. 2009, Ren, Lauckner et al. 2009)

1.1.2 Oxidativní stres

Oxidativní stres nastává v situacích, kdy produkce volných radikálů a jejich produktů převyšuje kapacitu antioxidačních systémů a dochází k molekulárnímu poškození, dysfunkci energetického řetězce s poškozením mitochondrií, nárůstu intracelulárního vápníku a k produkci dalších radikálů. Tvorba **volných kyslíkových radikálů** (*ROS – reactive oxygen species*; viz Obr.1) je jedním z mechanismů zapojujících se do časných fází agregace proteinů a oxidativní poškození jaderné i mitochondriální DNA, a je průvodním jevem u většiny neurodegenerativních onemocnění.(Uttara, Singh et al. 2009, Fang, Gu et al. 2017) Hlavním zdrojem ROS jsou elektrony uvolněné z dýchacího řetězce lokalizovaného na vnitřní membráně mitochondrií. Dýchací řetězec je finální fází buněčného dýchání zajišťující tvorbu buněčné energie ve formě ATP. Kromě interakcí s kyslíkem dochází k tvorbě radikálů také při železem asociované **Fentonově reakci**.(He, Yang et al. 2016) lipidové peroxidaci nebo nitrosylaci. Nejagresivnější jsou hydroxylový radikál a peroxyhydráty, které buňku poškozují oxidací proteinů, lipidů, mastných a nukleových kyselin.

Mezi narušením metabolismu kovů a zvýšenou tvorbou ROS je přímá souvislost. Redox-aktivní železo, které je uvolňováno do cytosolu z poškozených mitochondrií, katalyzuje vznik peroxidu vodíku (H_2O_2) a superoxidu (O_2^-), a je silným induktorem oxidativního stresu. Jeho hlavním cílem jsou proteiny a vzniklé proteinové ROS indukují reaktivní gliózu a oxidací glutathionu poškození vápníkového metabolismu.(Bond and Greenfield 2007, Ballatori, Krance et al. 2009)



Obr.1 – Přehled vztahů základních reaktivních forem kyslíku a dusíku

1.1.3 Mitochondriální dysfunkce a poruchy energetického metabolismu

Mitochondrie jsou hlavním producentem buněčné energie. V procesu neurodegenerace představují jak producenty kyslíkových radikálů, tak cíle jejich působení. (Murphy 2009, Zorov, Juhaszova et al. 2014) V průběhu fyziologického stárnutí dochází k postupnému snižování mitochondriálního metabolismu v neuronech i glii. (Boumezbeur, Mason et al. 2010) K patologickému poškození mitochondrií dochází nejčastěji poškozením mitochondriální DNA nebo enzymů buněčného dýchacího řetězce. S ohledem na heterogenitu mitochondriálních funkcí danou specifickými potřebami různých tkání a vlastnostmi okolního prostředí vykazují selektivní vulnerabilitu. (Dubinsky 2009) Oxidativním stresem poškozené mitochondrie se zapojují do bludného kruhu, který vede ke generování ROS.

U PN vedou mitochondriální dysfunkce k destabilizaci mikrotubulů a akcentaci oligomerizace αS . (Esteves, Arduino et al. 2010) Zajímavostí je role **parkinu**, ubiquitinové ligázy kódované genem PARK2, jehož mutace způsobuje dědičnou PN s časným počátkem (*early-onset Parkinsonova nemoc, EO-PN*). Zvýšené hladiny parkinu působí u mitochondriálních poruch a neurodegeneraci obecně protektivně (Davison, Pennington et al. 2009). Pacienti s Alzheimerovou nemocí (AN) vykazují výrazně redukováný obsah mitochondriální DNA (až na 50 %), specifická kauzální mutace zatím nebyla nalezena. (Mancuso, Calsolaro et al. 2009, Swerdlow and Khan 2009) U Huntingtonovy nemoci (HN) jsou popisovány vícečetné delece mitochondriální DNA až u 60% pacientů, (Banoei, Houshmand et al. 2007) což je vysvětlováno patologickým vlivem nestabilních CAG repetice a mutovaného huntingtinu na mitochondrie. (Quintanilla and Johnson 2009)

1.1.4 Poškození transportních funkcí

Poruchy neuronálního a axonálního transportu hrají významnou mechanistickou roli u většiny neurodegenerativních onemocnění. (De Vos, Grierson et al. 2008) Není však jasné, jestli je narušený

transport příčinou nebo následkem neurodegenerace. Poškození mohou způsobovat mutace **transportních proteinů**, kinesinu (anterográdní transport) nebo dyneinu (retrográdní transport), nebo stabilizátoru systému mikrotubulů (dystrofinu). Axonální pohyb τ proteinu probíhá rychlým transportem s využitím kinesinu, α S využívá v neuronech jak kinesinu, tak dyneinu.

Abnormální axonální transport je důležitý zejména v patofyziologii tauopatií. **τ protein** slouží jako mikrotubuly vázající protein. Jeho hyperfosforylovaná forma, vytvářející klubka, není této vazby schopna, mikrotubuly se stávají nestabilními a dochází k jejich ruptuře.(Terwel, Dewachter et al. 2002, Millecamps and Julien 2013, Rodriguez-Martin, Cuchillo-Ibanez et al. 2013) Příkladem odlišného mechanismu poškození je snížená neuronální reakce na nervový růstový faktor (NGF) při poruše retrográdního transportu, která vede ke zmenšení cholinergních neuronů.(Huang and Reichardt 2001, Harrington and Ginty 2013, Maor-Nof, Romi et al. 2016)

1.1.5 Zánětlivé změny

Na patogenezi chronického zánětu centrálního nervového systému (CNS) se podílí hlavní histokompatibilní komplex (*major histocompatibility complex II, MHC II*), gliální aktivace a porucha hematoencefalické bariéry.(Skaper, Facci et al. 2018) Věkově vázané zánětlivé změny se negativně podílejí na postižení neuronálních funkcí.(Lynch 2010) Není jasné, zda k poškození neuronů dochází hyperaktivitou zánětlivých a imunitních procesů nebo naopak nedostatečnou imunitní reakcí na s věkem se zvyšující stresovou zátěž.(Stolp and Dziegielewska 2009)

Mikroglie se dokáže dle okolností, stavu okolního prostředí a věku přepínat mezi prozánětlivým stavem M1 (kdy produkují prozánětlivé molekuly, např. tumor necrosis factor alfa nebo reaktivní formy kyslíku) a protizánětlivým nastavením M2 (kdy se zapojuje do reparačních procesů tkání).(Tang and Le 2016) Na rozdíl od mikroglie, **astrocyty** produkují primárně protizánětlivé a neuroprotektivní látky. Železo se do procesu neurodegenerace může zapojovat jak svými prozánětlivými i protizánětlivými účinky (blíže viz kapitolu 1.3.1).

Podíl zánětlivých změn je dobře prostudován u AN,(Sondag, Dhawan et al. 2009) kde se na něm podílí mikroglie, astrocyty, komplement, proteiny akutní fáze a prozánětlivé cytokiny a chemokiny. Mikroglie a astrocyty mohou generovat $A\beta$, který sám o sobě působí prozánětlivě a zpětně aktivuje glie i další složky zánětlivé kaskády. Dle některých studií mohou imunitní změny ukládání amyloidu a neuronální degeneraci předcházet.(Salminen, Ojala et al. 2009)

U **PN** jsou obecné zánětlivé změny srovnatelné s AN, ale navíc se konzistentně zapojuje aktivita mikroglie poškozující specificky dopaminergní neurony SN.(Gao, Kotzbauer et al. 2008) Na experimentálních modelech byla nejen potvrzena vyšší zranitelnost této populace buněk při deficitu parkinu, ale také škodlivý efekt neuromelaninu na zánětlivé změny a neurodegeneraci.(Zecca, Wilms et al. 2008)

1.2 Neurodegenerativní onemocnění

Neurodegenerativní poruchy vznikají často působením několika výše uvedených principů. Vedou k ukládání depozit proteinů a změně morfologie buněk a struktur CNS. Následující přehled nemocí je založen na tradičním dělení podle ukládaného patologického substrátu.

Díky zpřesnění vyšetřovacích metod bylo zjištěno, že řada neurodegenerativních onemocnění se klinicky i molekulárně-biologicky navzájem **překrývá (overlap syndrome)**, (Uitti, Berry et al. 1995, Imamura, Wszolek et al. 2007, Lim, Park et al. 2013) což činí jejich diagnostiku v některých případech nesnadnou. Mnoho patogenních lézí charakteristických pro neurodegenerativní poruchy se navíc do jisté míry objevuje i u stárnoucích zdravých mozků (např. ukládání A β) bez klinického korelátu. (Mann and Jones 1990, Price, Davis et al. 1991, Delaere, He et al. 1993, Armstrong 1995) Finální diagnóza je někdy stanovena až neuropatologickým vyšetřením. (Love 2004)

1.2.1 Onemocnění s hromaděním beta-amyloidu

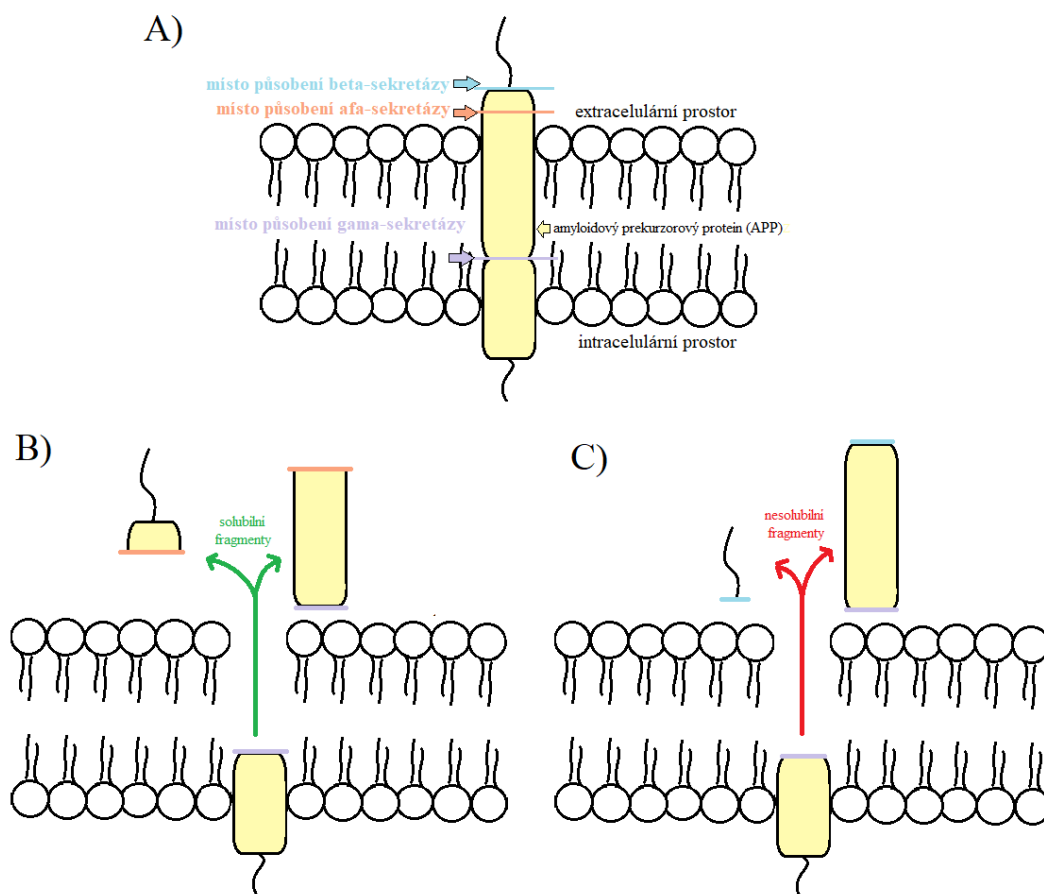
Amyloidový prekurzorový protein (APP) je transmembránový glykoprotein, který se zapojuje do růstu a reparace neuronů a podílí se na paměťových procesech. (Meziane, Dodart et al. 1998, Thinakaran and Koo 2008) Za normálních okolností je štěpen α -sekretázou a γ -sekretázou na solubilní fragmenty o délce 39-40 aminokyselin. Za patologických okolností dochází ke štěpení β -sekretázou a γ -sekretázou, výsledný peptid obsahující 42-43 aminokyselin je nesolubilní a polymeruje v extracelulárním prostoru jako A β (viz Obr.2). (Chow, Mattson et al. 2010) Vznikající plaky narušují viabilitu přilehlých neuronů a vedou k jejich zániku. Ten aktivuje glie, v místě vzniká sterilní zánět s aktivuje se cyklooxygenáza 2 a prozánětlivé cytokiny. Na konci tohoto řetězce dochází k šíření neurodegenerace indukované vytvořenými volnými kyslíkovými radikály a zvýšeně produkovanými excitačními aminokyselinami. (Sastre, Walter et al. 2008)

1.2.1.1 Alzheimerova nemoc

AN je progresivní neurodegenerativní onemocnění charakterizované demencí, poruchami paměti a chování a postižením běžných životních činností. Zánik populace cholinergních neuronů v predilekčních oblastech mozkové kůry (temporální lalok, hipokampus, asociační oblast neokortexu) a podkoří (ncl. basalis Meynerti) vede k nedostatku **acetylcholinu** v mozku. U AN dochází k ukládání abnormálních proteinů: A β extracelulárně do plak a abnormálně fosforylovaného τ proteinu do neurofibrilárních klubek intracelulárně. (Francis 2005, Kumar, Singh et al. 2015, Bondi, Edmonds et al. 2017, Dos Santos Picanco, Ozela et al. 2018)

Jedná se o nejčastější příčinu demence se zvyšující se prevalencí mezi 65. a 85. rokem věku. Každých 5 let se riziko rozvoje zdvojnásobuje (3% riziko v 7.dekádě, 30 % v 9.dekádě). (Brookmeyer,

Gray et al. 1998) Mezi **rizikové faktory** rozvoje AN patří kromě věku také ženské pohlaví, opakované úrazy hlavy, vaskulární rizika nebo nikotinismus.(Chen, Siddarth et al. 2014, Ostergaard, Mukherjee et al. 2015) Většinou se jedná o sporadické formy, ale existují i familiární s autozomálně dominantní dědičností. Genetickým podkladem jsou mutace APOE-4, amyloidového prekurzorového proteinu nebo presenilinu.



Obr. 2 – A) místa štěpení amyloidového prekurzorového proteinu (APP); B) fyziologické štěpení APP α -sekretázou; C) patologické štěpení β -sekretázou

1.2.2 Tauopatie

Tau je přirozená bílkovina podílející se na výstavbě a stabilizaci mikrotubulů. Různou transkripcí jednoho genu vzniká několik izoform, které se o sebe liší počtem AMK (29-58) a vytváří odlišné vazby. Změna poměru mezi izoformami vede k poruše jejich seskupování, narušení axonálního transportu a zániku neuronů.(Goedert and Jakes 2005) **Mutovaný τ protein** se nachází nejen v axonech, ale i v těle neuronu a v dendritech. V navázané formě má mutovaný τ protein tendenci k hyperfosforylaci a shlukování, což je podklad vzniku intracelulárních neurofibrilárních klubek.(Lippens, Sillen et al. 2007, Fontaine, Sabbagh et al. 2015)

1.2.2.1 Progresivní supranukleární obrna

Progresivní supranukleární obrna (PSP) je sporadické neurodegenerativní onemocnění charakterizované v počátcích instabilitou stoje a chůze s časnými neprovokovanými pády, poruchami okulomotoriky (vertikální pohledové parézy se zachovalým okulocefalickým reflexem) a chování a kognitivním deficitem. Postupně se přidávají další symptomy: axiální rigidita, celková bradykineze, dystonie, dysfagie a dysartrie. Klinické obtíže začínají obvykle mezi 50.-70. rokem věku.

1.2.2.2 Kortikobazální degenerace

Kortikobazální degenerace je vzácné neurodegenerativní onemocnění vyznačující se asymetrickým parkinsonským syndromem, končetinovou apraxií někdy doprovázenou dystonií nebo myoklonem (*alien hand*) a těžkým kognitivním deficitem. Obvyklý věk začátku onemocnění je 65 let s průměrným přežitím 8 let.(Armstrong, Litvan et al. 2013, Parnera, Rodriguez et al. 2016, Saranza, Whitwell et al. 2019)

Někdy je u pacientů s kortikobazální degenerací přítomna také porucha okulomotoriky charakteru parézy vertikálního pohledu. Tento příznak je silně asociován s patologií **TDP-43** (*transactive response DNA-binding protein*) v oblasti tekta a tegmenta a často vede k chybné diagnóze progresivní supranukleární obrny (PSP). Patologie TDP-43 byla popsána u 45 % kortikobazální degenerace a u 18 % PSP.(Koga, Kouri et al. 2018) Obě onemocnění vykazují překrývající se neuropatologické změny s prokázanými mnohočetnými neuronálními a gliálními lézemi šedé i bílé hmoty. Jsou tvořeny depozity nerozpustného fosforylovaného τ proteinu. Tyto shluky se nacházejí v celém mozku a indukují neuronální degeneraci SN a kortexu.(Dickson, Bergeron et al. 2002)

1.2.3 Alfa-synukleinopatie

α S je protein podílející se na synaptické plasticitě, který dosahuje v mozku vysokých koncentrací. Při mutaci genu PARK-1 pro tvorbu α -synukleinu na 4.chromozomu vzniká defektní bílkovina s tendencí k oxidativnímu poškození, oligomerizaci a agregaci.(Meade, Fairlie et al. 2019) Někdy může působit patologicky i nemutovaný protein, který má nepravidelnou šroubovicovou strukturu. Například vlivem oxidativního stresu nebo přítomností reaktivních forem železa vznikají v oblasti dopaminergních buněk SN shluky, tzv. **Lewyho tělíška**, které jsou neuropatologickou známkou zániku neuronů.(El-Agnaf and Irvine 2000, Barker and Williams-Gray 2016) Jejich přítomnost je popisována u PN, DLB, multisystémové atrofie (MSA) a AN.

Společným příznakem synukleinopatií, který může pomoci s jejich diagnostikou, je porucha chování v REM spánku (**RBD**, viz Kapitulu 4.3.1).(Boeve, Silber et al. 2001, Boeve, Silber et al. 2003, Boeve 2010)

1.2.3.1 Parkinsonova nemoc

PN je **nejčastější synukleinopatií** vyznačující se obvykle pomalu progredujícím parkinsonským syndromem a dalšími motorickými i non-motorickými příznaky. Prevalence PN v populaci je 1-2:1000 obyvatel s výrazným nárůstem ve věkové kategorii nad 65 let (1-2:100).(Clarke 2007, Poewe, Seppi et al. 2017) Geneticky podmíněných forem je cca 5-10 % (zejména PARK geny).(Kumar, Lohmann et al. 2012) Průměrný věk na počátku klinických obtíží je 50 let a poměr mužů a žen je 1,2:1. Onemocnění snižuje přežití oproti ostatní populaci o cca 10 let u EO-PN (cca 10 %) a o cca 3–5 let u PN s pozdním začátkem (>75let věku). V začátku onemocnění bývá postižení hybnosti jednostranné, s progresí v čase dochází k rozšíření i na druhostranné končetiny. U PN je přítomna odpovídavost na dopaminergní léčbu.(Armstrong and Okun 2020)

PN se může manifestovat několika **odlišnými formami**: 1. tremor dominantní (klidový tremor o frekvenci 4-6 Hz) s obvykle pomalejší progresí a lepší prognózou; 2. forma s dominující akineziou a rigiditou a 3. forma s dominující posturální instabilitou a poruchou chůze (PIGD), u které je průběh rychlejší s časnějším nástupem demence.(Schiess, Zheng et al. 2000, Selikhova, Williams et al. 2009, Prodoehl, Planetta et al. 2013)

Mezi **nonmotorické příznaky PN** patří: 1. poruchy spánku (porucha chování v REM fázi spánku [RBD], syndrom neklidných nohou [RLS], fragmentace spánku, zvýšená denní spavost nebo imperativní spánky); 2. senzorické příznaky (parestzie končetin, bolest, hyposmie, poruchy zraku); 3. neuropsychiatrické příznaky (deprese, psychóza, apatie, demence,) a 4. autonomní příznaky (zácpa, sexuální poruchy).(Chaudhuri, Healy et al. 2006, Salawu, Danburam et al. 2010, Rana, Ahmed et al. 2015, Schapira, Chaudhuri et al. 2017)

Absence odpovídavosti na levodopu, anebo přítomnost příznaků jako jsou pády, instabilita, dysartrie, dysfagie, autonomní dysfunkce, demence v časně fázi onemocnění signalizují možnost atypického parkinsonského syndromu (MSA, PSP, DLB).(McFarland 2016, Deutschlander, Ross et al. 2018)

1.2.3.2 Multisystémová atrofie

MSA je sporadické neurodegenerativní onemocnění, postihující osoby starší 30 let (nejčastěji kolem 55 roku věku), u kterého dochází k akumulaci alfa-synukleinu predominantně v gliích. Gliální intracytoplazmatické inkluze jsou přítomné v bazálních gangliích, mozečku, motorických oblastech kůry, kmeni a autonomních gangliích. (Lynch and Sima 1996, Tu, Galvin et al. 1998, Ishizawa, Komori et al. 2008)

Podle klinicky dominujícího počátečního obrazu rozlišujeme 2 formy onemocnění s dominujícími parkinsonskými příznaky (MSA-P, okolo 70 % případů) nebo mozečkovým postižením (MSA-C, okolo 30 % případů). V průběhu další progresse onemocnění obvykle dochází ke kombinaci obou syndromů.(Naka, Ohshita et al. 2002, Ozawa and Onodera 2017) Motorickým projevům často předchází RBD a autonomní dysfunkce (ortostatická hypotenze, poruchy sfinkterů, erektilní dysfunkce). Patognomickým příznakem MSA je **laryngeální stridor**.(Yamaguchi, Arai et al. 2003, Ozawa, Sekiya et al. 2016, Cortelli, Calandra-Buonaura et al. 2019)

1.2.3.3 Demence s Lewyho tělísky

Kromě parkinsonského syndromu se *DLB* vyznačuje fluktuujícími kognitivními a behaviorálními poruchami. Nástup prvních příznaků bývá po 70. roku věku s průměrným pětiletým přežitím. Pacienti trpí také vizuálními halucinacemi a strukturovanými nevyvratitelnými bludy. Zajímavostí je současně paradoxně přítomná hypersenzitivita k antipsychotikům. (Ferman, Smith et al. 2004, Donaghy, Barnett et al. 2017, McKeith, Boeve et al. 2017)

V patogenezi DLB se kromě ukládání synukleinu uplatňuje i porucha syntézy acetylcholinu, a proto pacienti mohou dočasně profitovat z léčby inhibitory acetylcholin-esterázy.(Kim, Kagedal et al. 2014)

1.2.4 Polyglutaminová onemocnění

Skupina neurodegenerativních onemocnění způsobena expanzí CAG tripletů vedoucích k prodloužení polyglutaminového řetězce a vzniku proteinů s abnormální strukturou a funkcí. U těchto onemocnění dochází při mezigeneračním přenosu k nárůstu počtu tripletů, zejména při paternální dědičnosti (**fenomén anticipace**).(Carpenter 1994) S rostoucím počtem tripletů klesá věk klinického počátku nemoci a urychluje se progresse postižení. Mezi tripletová onemocnění patří např. HN a některé spinocerebelární ataxie (SCA 1,2,3,6,7,17).(Fan, Ho et al. 2014, Stoyas and La Spada 2018, Lieberman, Shakkottai et al. 2019)

1.2.4.1 Huntingtonova nemoc

HN je kauzálně neléčitelné autozomálně dominantně dědičné onemocnění podmíněné zmnožením tripletů CAG (>36-39 opakování) v genu huntingtinu na 4. chromozomu. Onemocnění se manifestuje nejčastěji ve středním věku, ale u juvenilní, Westphalovy, formy se příznaky objevují do 20. roku věku a u late onset formy po 60. roku věku.(Nance and Myers 2001) Pro HN jsou typické poruchy volní motoriky, mimovolní pohyby, kognitivní a behaviorální poruchy.(Roos 2010,

Pringsheim, Wiltshire et al. 2012, McColgan and Tabrizi 2018) Nejvíce postiženými oblastmi mozku jsou striatum a kortex.

1.2.5 Metabolicky podmíněné neurodegenerace s akumulací kovů

1.2.5.1 Wilsonova nemoc

WN je autozomálně recesivní porucha metabolismus mědi podmíněná mutací genu **ATP7B**.(Chen, Shen et al. 2015, Chang and Hahn 2017) Důsledkem je defekt inkorporace mědi do ceruloplasminu, porucha exkrece mědi do žluči a kumulace kovu ve tkáních (mozek, játra, descemetská membrána rohovky atd.). Dle dominující symptomatologie rozlišujeme cerebrální, hepatální a smíšenou formu. Cerebrální forma vzniká typicky po 18. roku věku a postupně se projevuje poruchami hybnosti, kognice a chování. Hepatální forma vzniká často již před 10. rokem věku, někdy až pod obrazem akutního jaterního selhání nebo postupným rozvojem fibrózy až cirhózy. Mezi další systémové projevy kumulace mědi patří postižení renální, hematologické, kostní, kožní a oční (Kayser-Fleischerův [K-F] prsteneček).

Příznaky cerebrální formy WN jsou velice pestré, patří mezi ně tremor, dysartrie, parkinsonismus, mozečkové projevy, posturální poruchy nebo dystonie. U cca 75 % pacientů se projevují psychiatrické symptomy jako úzkost, deprese, psychotické projevy nebo kognitivní deficit charakteru exekutivní dysfunkce.(Wu, Wang et al. 2015, Ferenci and Ott 2019, Hermann 2019) Diagnostika je založena na **Lipských kritériích** (viz Tabulku 1).(Ferenci, Caca et al. 2003)

Tabulka 1 - Bodovací systém 8. Mezinárodního setkání zaměřeného na WN, Lipsko 2001

Typické klinické symptomy a příznaky		Ostatní testy	
K-F prsteneček		Obsah sušiny mědi v játrech	
přítomný	2	> 4 μmol/g	2
nepřítomný	0	0,8-4 μmol/g	1
Neurologické příznaky		normální (<0,8 μmol/g)	-1
závažné	2	přítomnost rhodanin pozitivních granul	1
středně vážné	1	Odpady mědi do moči	
mírné	0	normální	0
Hladina ceruloplasminu v séru		1-2x vyšší	1
normální (> 0,2 g/l)	0	> 2x vyšší	2
0,1-0,2 g/l	1	normální, ale po podání penicilaminu > 5x vyšší	2
<0,1 g/l	2	Genetické vyšetření mutací	
Coombs negativní hemolytická anémie		mutace na obou chromozomech	4
přítomna	1	mutace na jednom chromozomu	1
nepřítomna	0	mutace nezjištěna	0
SOUHRNNÉ SKÓRE – HODNOCENÍ			
4 a více	diagnóza jistá		
3	diagnóza možná, nutné další vyšetření		
2 a méně	diagnóza nepravděpodobná		

K běžným laboratorních abnormitám patří hladina ceruloplasmin $<0,2\text{g/l}$; volné měď v séru $>1,6\ \mu\text{mol/l}$; odpady mědi v moči $>1,6\ \mu\text{mol}/24\ \text{hod.}$ V jaterní biopsii koncentrace mědi $>250\ \mu\text{g/g}$ (zánětlivé změny, depozita mědi) a na oční vyšetření šterbinovou lampou K-F prstenec (limbus rohovky). Genetické vyšetření je limitováno velikostí genu a vysokým množstvím známých, a nejspíše dalších, zatím nezjištěných, mutací.

Správná a včasná diagnóza WN je zcela zásadní a musí být zvažována u každého pacienta s časným nástupem komplexní (zejména extrapyramidové) neurologické symptomatiky. Počátek onemocnění je obvykle mezi 15.-45. rokem věku. Dříve všeobecně přijímaná hranice do 45 let věku byla vyvrácena, k primomanifestaci WN může dojít i ve významně vyšším věku (Ferenci and Ott 2019) (v naší studii bylo nejstaršímu de novo pacientovi 58 let; viz Kapitulu 4.1). Prognóza, tíže klinického postižení a další vývoj jsou silně závislé na včasném zahájení terapie cheláty nebo zinkem. (Delangle and Mintz 2012)

1.2.5.2 Neurodegenerace s akumulací železa

Neurodegenerace s akumulací železa (*neurodegeneration with brain iron accumulation, NBIA*) jsou heterogenní skupinou vzácných geneticky podmíněných onemocnění (viz Tabulku 2). Postihují jak proteiny přímo zapojené v metabolismu železa (např. aceruloplasminémie a neuroferitinopatie), tak proteiny zapojené v jiných signalizačních či metabolických cestách (neurodegenerace asociovaná s pantotenátkinázou – PKAN). Většina onemocnění se projevuje již v dětském věku, ale adultní formy nejsou výjimkou. Z klinických příznaků dominuje extrapyramidová symptomatika (dystonie, dysartrie, ataxie), spastická paréza, dále retinopatie a psychické poruchy. (Gregory and Hayflick 1993, Goldman, Eichenseer et al. 2013, Hogarth 2015, Meyer, Kurian et al. 2015, Batla and Gaddipati 2019)

Nejčastěji se vyskytující NBIA je **PKAN** (dříve Hallervordenův-Spatzův syndrom) způsobená mutací genu pro pantothenátu-kinázu typ 2 (PANK2), který kóduje mitochondriální enzym nutný k syntéze koenzymu A, syntéze lipidů a správné funkci Krebsova cyklu. PKAN se manifestuje poruchami chůze s pády, generalizovanou dystonií, parkinsonským syndromem, postižením pyramidové dráhy a kognitivním deficitem. První příznaky se objevují u typické formy kolem 6. roku věku, ale existují i pacienti s počátkem příznaků ve 3. dekádě. (Gregory and Hayflick 1993)

Dalším představitelem NBIA je neurodegenerace asociovaná s mitochondriálním membránovým proteinem (*mitochondrial membrane protein-associated neurodegeneration, MPAN*), který je z patologického hlediska synukleinopatií s přítomností Lewyho tělísek a Lewyho neuritů v bazálních gangliích a neokortexu a akumulací železa v globus pallidus a SN. (Gregory, Hartig et al. 1993)

Neuroferitinopatie je způsobená autozomálně dominantní mutací genu kódujícího lehký řetězec feritinu (*ferritin light polypeptide, FTL*). Poucha jeho funkce vede ke kumulaci železa v globus pallidus, putamen, nucleus dentatus a mozečku. Klinicky se manifestuje obvykle až kolem 40. roku kognitivními a motorickými příznaky (parkinsonismus, dystonie, chorea, lehký kognitivní deficit). Klinický obraz často připomíná příznaky pozorované stárnoucích lidí ve vysokém věku (Wills, Sawle et al. 2002), ale v některých případech může připomínat HN. (Chinnery 1993, Levi and Rovida 2015, Kumar, Rizek et al. 2016)

Aceruloplasminémie je podmíněná mutací genu pro ceruloplasmin, která vede ke snížení nebo kompletnímu vymizení jeho enzymatické feroxidázové funkce. Manifestuje se v dospělém věku pestrým multiorgánovým postižením (mozek, játra, pankreas, slezina). Typickými laboratorní nálezy jsou elevace feritinu v séru, snížení sérového železa a mědi (s normální hladinou odpadů mědi v moči) a mikrocytární anémie. (Piperino and Alessio 2018, Marchi, Busti et al. 2019, Vroegindeweij, Boon et al. 2019)

Tabulka 2 – Přehled vybraných neurodegenerací s akumulací železa

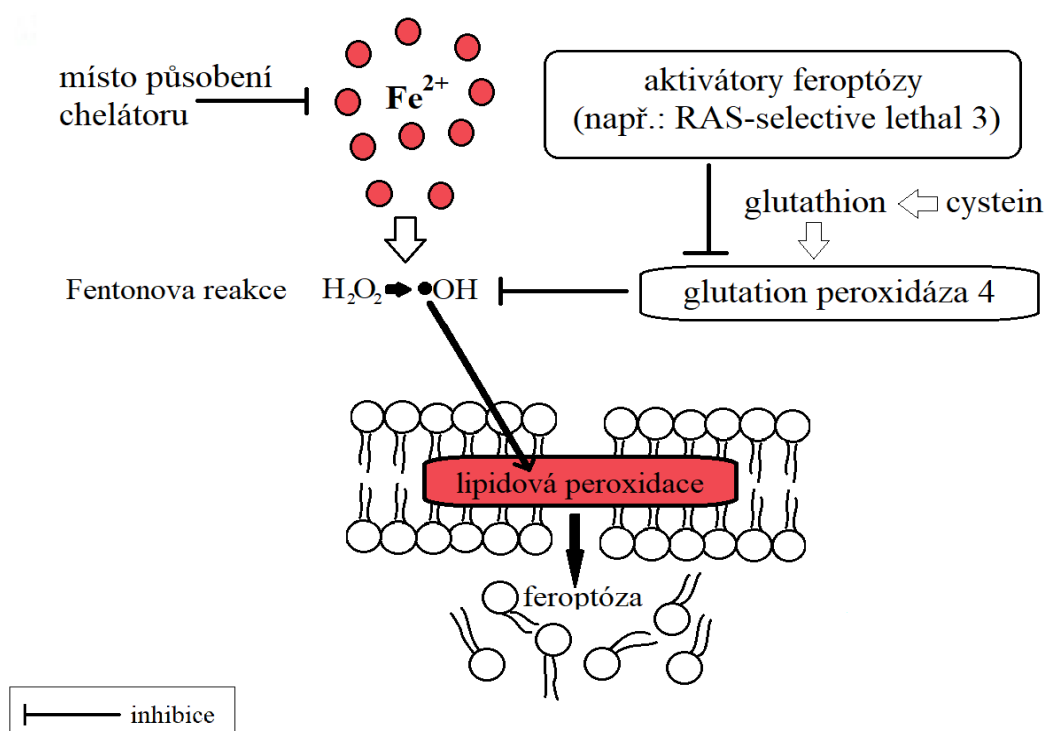
Název nemoci	Postižený gen	Typ dědičnosti
PKAN	PANK2	AR
PLAN	PLA2G6	AR
MPAN	C19orf12	AR
BPAN	WDR45	XD
FAHN	FA2H	AR
Neuroferitinopatie	FTL	AD
Aceruloplasminémie	CP	AR
CoPAN	COASY	AR

PKAN – neurodegenerace asociovaná s pantotenátkinázou; PLAN – neurodegenerace spojená s fosfolipázou A2; MPAN – neurodegenerace asociovaná s mitochondriálním membránovým proteinem; BPAN – neurodegenerace asociovaná s beta-propeller proteinem; FAHN – neurodegenerace asociovaná s hydroxylázou mastných kyselin; CoPAN – neurodegenerace asociovaná s proteinem syntetizujícím koenzym A; AR – autozomálně recesivní; XD – dominantní X-vázaná; AD – autozomálně dominantní

1.3 Kovy v centrální nervovém systému

Kovy, jako kofaktory mnoha proteinů, hrají v lidském těle významnou roli, zejména v energetickém metabolismu, regulaci genové exprese, neurotransmisi či ochraně organismu proti tvorbě kyslíkových radikálů. (Lakatos, Szentmihalyi et al. 2004, Zoroddu, Aaseth et al. 2019) Na druhou stranu zvýšená akumulace kovů působí v nervovém systému toxicky a vede k neurodegeneraci (jednotlivé mechanismy jsou uvedeny v Kapitole 1.1).

K buněčné smrti dochází několika různými způsoby: 1) nekrotózou, dojde k otoku cytoplazmy a organel a ruptuře buněčné stěny; 2) apoptózou se smrštěním buňky, kondenzací jádra a vytvoření apoptických tělísek; nebo 3) ferroptózou.



Obr. 3 – Princip indukce ferroptózy

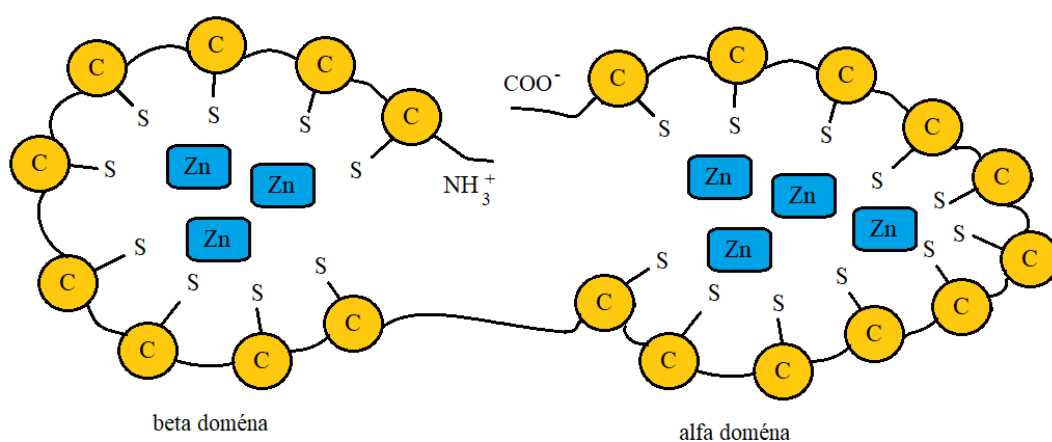
Feroptóza je v roce 2012 nově objeveným způsobem programované buněčné smrti závislým na zvýšených hladinách železa. U ferroptózy hrají významnou roli mitochondrie, dochází nejen ke zmenšení jejich objemu, ale také k redukcí mitochondriálních krist. Ačkoliv se propustnost buněčné membrány zvyšuje, zůstává neporušena stejně jako buněčné jádro. Mechanismem smrti buňky u ferroptózy je snížení antioxidační funkce glutathion peroxidázy 4 vedoucí k zvýšené koncentraci Fe^{2+} , produkci kyslíkových radikálů a peroxidaci lipidů (viz Obr.3). Ferroptóza je adaptivním procesem odstraňujícím maligní nebo zánětem a stresem poškozené buňky. Z neurodegenerací se

pravděpodobně podílí na rozvoji AN, PN a HN.(Yang and Stockwell 2016, Stockwell, Friedmann Angeli et al. 2017, Han, Liu et al. 2020, Li, Cao et al. 2020)

Hlavní způsobem vstřebání kovů je příjem potravou nebo inhalací. Toxicita se odvíjí od vnitřního prostředí (pH), formy kovu a rychlosti jeho průchodu organismem. Vstřebávání kovů probíhá aktivním i pasivním transportem, krví jsou transportovány k detoxikaci do jater a ledvin a jsou vylučovány močí a stolicí. Kromě jater dochází ke kumulaci kovů také v mozku a kostech.(Clarkson 1987)

Změny hladin jednoho kovu mají signifikantní efekt na homeostázu ostatních. K ovlivňování dochází sdílením transportních systémů a signalizačních drah. **Interakce mezi kovy** mohou jejich toxicitu zvyšovat i snižovat (typickým příkladem jsou interakce mědi a zinku u WN).(Sharp 2004, Arredondo, Martinez et al. 2006, Gulec and Collins 2014)

Hladiny kovů v lidském těle jsou ovlivňovány kov vázajícími nízkomolekulárními, intracelulárními proteiny s vysokým podílem cysteinu – **metallothioneiny (MT)**. U savců jsou známký 4 izoformy (MT1-MT4) z nich MT1 a MT2 jsou exprimovány téměř ve všech orgánech a tkáních a jejich produkce je indukována různými stresory (těžkými kovy, oxidačním stresem nebo prozánětlivými cytokiny). Méně zastoupené MT3 a MT4 jsou exprimovány hlavně v mozku. Všechny metallothioneiny obsahují dvě vazebné domény: N-terminální β -doménu a C-terminální α -doména (viz Obr.4). Tyto domény se liší schopností vázat kovové ionty a jejich konformace je ovlivňována interakcí mezi nimi. Nejčastěji váží zinek a měď. Kromě transportu, skladování a detoxikace kovů mají MT schopnost vychytávat volné radikály. Zvýšená exprese MT chrání buňky i před plánovanou apoptózou a může být spojena s nádorovým bujením (např.: ca prsu, GIT nebo prostaty). Snižená exprese vazebných peptidů je spojena se zhoršenou detoxikací zejména těžkých kovů a mnoha neurologickými onemocněními.(Coyle, Philcox et al. 2002, Thirumoorthy, Shyam Sunder et al. 2011)

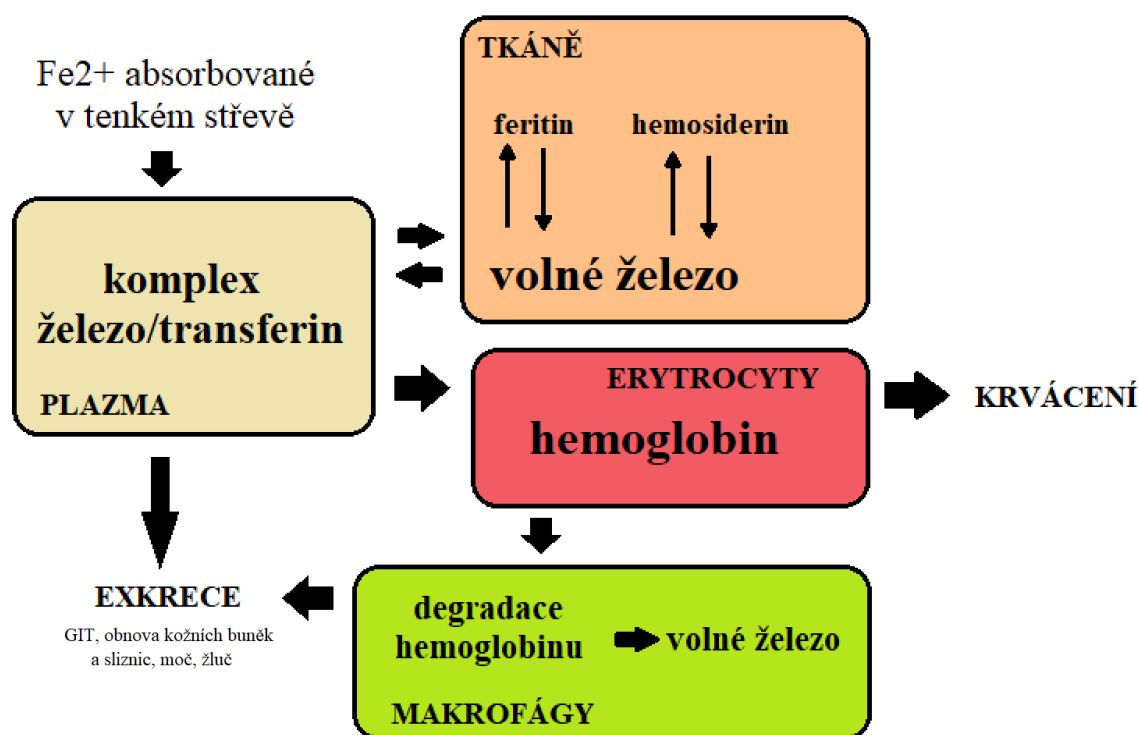


Obr.4 – Molekulární struktura metallothioneinu

1.3.1 Železo

Železo je v těle významným kofaktorem mnoha buněčných procesů – transportu kyslíku, oxidativní fosforylace, produkce myelinu, syntézy neurotransmiterů. Jeho nadměrné koncentrace, zejména v případě volného metabolicky aktivního kovu, mohou vést k tvorbě kyslíkových radikálů a sekundárním strukturálním změnám, např. peroxidaci lipidů. (Abbaspour, Hurrell et al. 2014)

Železo je přijímáno primárně potravou a zejména u dětí může dojít k alimentární otravě. (Yuen and Becker 2020) U dospělých dochází ke zvýšené kumulaci železa v CNS obvykle sekundárně, při narušení jeho metabolismu a homeostázy. Ze střeva přijaté trojmocné železo (Fe^{3+}) je v enterocytech duodena redukováno cytochromem B na dvojmocnou formu (Fe^{2+}). Do krevního oběhu je uvolňováno díky **feroportinu**, kde je opět oxidováno feroxidázou ceruloplasminem (případně hephestinem) na Fe^{3+} a navázáno na cirkulující apo-transferin. Z oběhu je do buněk železo vstřebáváno endocytózou přes transferinové receptory. Po vstupu do buněk je železo transportováno endosomem, odkud je transportérem dvojmocných kovů (*divalent metal transporter*, **DMT1**) uvolněno do cytoplazmy. Část volného železa se zapojí do metabolických procesů (např. v mitochondriích), zbytek se naváže na feritin, hemosiderin nebo je uložen do lysozomů (viz Obr.5). (Cook 1990, Hentze, Muckenthaler et al. 2010, Tandara and Salamunic 2012)

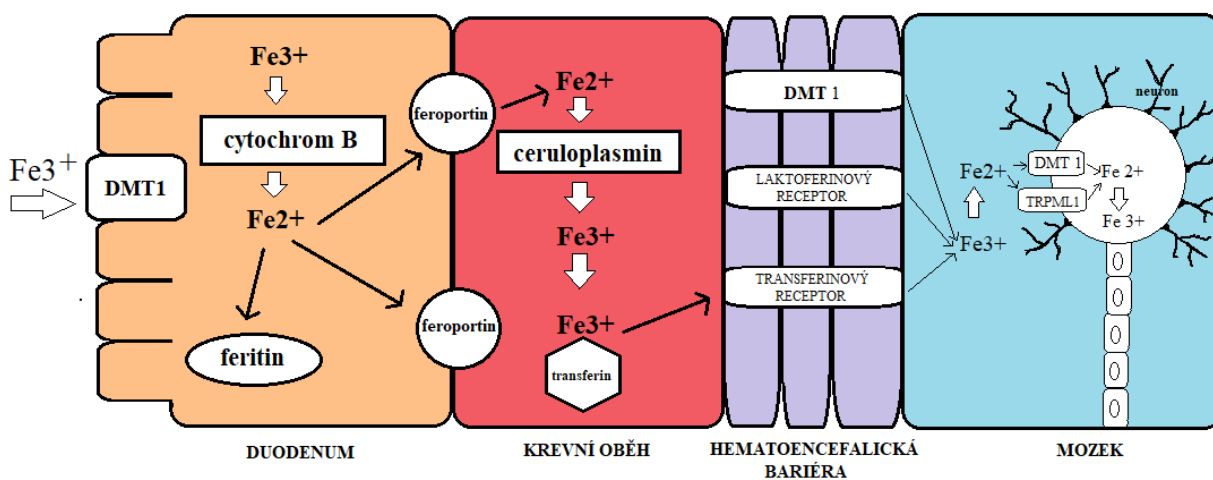


Obr. 5 – Metabolismus železa v lidském organismu

Feritin je nejběžnější skladovací protein železa. Je tvořen dvěma podjednotkami – lehkým a těžkým řetězcem. Poměr jejich zastoupení se liší podle tkáně a aktuální potřeby organismu. Těžká podjednotka je schopna železo rychleji vázat a uvolňovat a je tedy zastoupena ve tkáních k vysokou potřebou železa a nízkou schopností jeho skladování. Lehká podjednotka je molekulárně stabilnější a slouží ke skladování zásobního železa (jedna molekula pojme až 4500 iontů).(Wang, Knovich et al. 2010) Za fyziologických okolností nejvíce železa potřebují a skladují pro axonální myelinizaci oligodendrocyty. V nich uložené železo navázané na feritin a transferin není reaktivní.(Qian and Shen 2001, McCarthy and Kosman 2015, Qian and Ke 2019)

Homeostáza železa je regulována v krvi cirkulujícím **hepcidinem** ovlivňujícím feroportin. Při nadbytku železa v krvi je feroportin internalizován a degradován, čímž se zamezí dalšímu uvolňování železa z buněk. Naopak při poklesu koncentrace cirkulujícího železa syntéza hepcidinu klesá.(Ganz and Nemeth 2012) Při kumulaci potenciálně toxického železa se v CNS do udržení rovnováhy zapojuje také **neuromelanin** (zejména v SN a locus coeruleus), který působí jako chelátor a vychytává volné železo z cytosolu neuronů.(Zecca, Casella et al. 2008) Pokud je volné železo konvertováno do méně stabilní zásobní molekuly hemosiderinu, je situace opačná. **Hemosiderin** má tendenci k výměně elektronů s okolním prostředím, čímž může iniciovat vznik volných radikálů (zejména Fentonovou reakcí: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO\cdot + OH^- + Fe^{3+}$). (Iancu 1992)

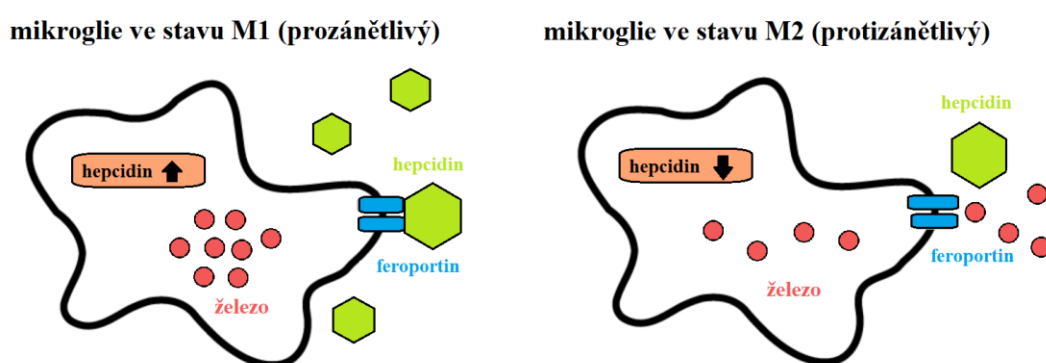
V těle existuje několik **endogenní antioxidantů** a enzymů redukujících volné radikály. V mozku je jedním z nich glutathion, jehož redukováná forma interaguje s peroxidem vodíku a dalšími organickými peroxidy, čímž snižuje pravděpodobnost jejich reakcí s železem. Reakci katalyzuje glutathion peroxidáza. Dalším antioxidantem je α - tokoferol, derivát vitamínu E, který omezuje peroxidaci lipidů darováním svého protonu reaktivním formám kyslíku, čímž jim poskytuje větší stabilitu. (Rizzo, Berselli et al. 2010, Liu, Ren et al. 2018)



Obr.6 – Enzymy a transportéry zapojené v metabolismu železa; DMT 1 – divalent metal transporter 1; TRPM1 – transient receptor potential mucolipin 1

Komplex transferin-Fe není schopen procházet hematoencefalickou bariérou, musí tedy využívat alternativních **transportních možností** – DMT1, transferinového receptoru (procesem endocytózy) nebo laktoferinového receptoru (viz Obr.6). Buňkami s hlavní rolí v regulaci absorpce železa do mozku jsou, kromě endotelu mozkových kapilár, **astrocyty**, jejichž výběžky jsou součástí hematoencefalické bariéry. Protože neexprimují transferinový receptor, absorbují za běžných okolností železo pomocí DMT1 nebo kanály kanonické signalizace (*transient receptor potential canonical channel*, *TRPC*). (Pelizzoni, Zacchetti et al. 2013) Při aktivaci prozánětlivými cytokiny exprimují astrocyty odlišnou izoformu DMT1 (DMT1-1A), která je za fyziologických okolností exprimována na apikální membráně enterocytů. (Hubert and Hentze 2002) Výdej železa z astrocytů probíhá pomocí feroportinu a ceruloplasminu (jeho nedostatek tedy vede ke kumulaci železa primárně v astrocytech).

V mozku železo cirkuluje mezi neurony, mikroglíí a astrocyty. Přesný mechanismus této cirkulace ani princip transportu železa z buněčného těla do axonu nejsou známy. Transferin je v mozku exprimován pouze choroidálními plexy a oligodendrocyty. Feritin je přijímán přestupem z krevního oběhu přes hematoencefalickou bariéru (HEB), mezi kandidáty jeho přímé endogenní produkce v mozku patří mikroglie (McCarthy, Sosa et al. 2018).



Obr. 7 – Změny využití železa v závislosti na reakci glie na zánět: vlevo v prozánětlivém (M1) stavu a vpravo v protizánětlivém (M2) stavu

Příjem železa do neuronů a glie je závislý na jeho aktuální koncentraci, která je ovlivněna nejen věkem, ale i případnými neurodegenerativními procesy. (Bradbury 1997, Jimenez-Jimenez, Molina et al. 1998, Molina, Jimenez-Jimenez et al. 1998) Během zánětů se v neuronech a mikroglíi koncentrace železa zvyšuje (viz Obr.7). Zejména u astrocytů dochází při nadbytku železa k aktivaci dalších mechanismů jeho odstraňování ze synaptické štěrbin, aby nedošlo k sekundárnímu poškození neuronů. (Pelizzoni, Zacchetti et al. 2013)

Mechanismy **vstupu železa do neuronů** nejsou zcela objasněny a pravděpodobně se mezi jednotlivými oblastmi mozku mohou lišit.(Codazzi, Pelizzoni et al. 2015) U excitačních synapsí hippocampu je železo do neuronů přijímáno přímou aktivací podskupiny glutamátových NMDA receptorů (N-methyl-D-asparagová kyselina) a nepřímou aktivací napěťově řízených vápenatých kanálů.(Pelizzoni, Macco et al. 2011, Lopin, Gray et al. 2012) V jiných oblastech mozku se do příjmu železa do neuronů zapojuje DMT1. Jeho aktivita je ovlivňována synaptickou aktivitou a je zvýšeně exprimován při patologických stavech (například u PN).(Codazzi, Pelizzoni et al. 2015)

Vzhledem k tomu, že k hromadění železa v organismu za normálních okolností nedochází, nejsou ani mechanismy jeho **exkrece** příliš efektivní. Z organismu je železo vylučováno krvácením nebo ztrátou kožních a gastrointestinálních buněk. Případný nadbytek bývá za fyziologických okolností kompenzován zvýšením erythropoézy nebo zvýšeným ukládáním do tkání.(Hunt, Zito et al. 2009)

Tabulka 3 – Přehled zapojení buněk centrálního nervového systému do metabolismu železa

	Neurony	Astrocyty	Oligodendrocyty	Mikroglie
Vztah k železu	utilizace a skladování	příjem z krevního oběhu do CNS	skladování a utilizace železa pro myelinizaci	skladování železa (M1 stav); uvolňování železa (M2 stav)
Exprese transferinového receptoru	ano	ne	ano	ne
Exprese DMT1	ano (dominantně)	ano	ne	ne
Produkce transferinu	ne	ne	ano	ne
Zvýšení spotřeby železa při zánětu	ano	ano	ne	ano
Závislost obsahu železa na věku	ano	ano	ne	ano

DMT1 – divalent metal transporter 1; CNS – centrální nervový systém

1.3.2 Měď

Měď je po železe a zinku třetím nejhojnějším kovem obsaženým v játrech.(Lewinska-Preis, Jablonska et al. 2011) V lidském těle působí jako významný **kofaktor** mnoha enzymů (např. cytochromu c oxidázy nebo superoxidodismutázy) a podílí se také na syntéze neurotransmiterů. Nicméně redoxní potenciál mědi z něj zároveň činí kov s vysokým potenciálem neurotoxicity.(Turnlund 1998, Bost, Houdart et al. 2016) Vstup mědi do buněk je zprostředkován buď DMT1 nebo transportérem specifickým pro měď (*copper transport protein, Ctr1*).(Prohaska 2008, Gupta and Lutsenko 2009)

Přísná **homeostáza mědi** je nezbytně nutná, protože pro mozek škodlivé jsou jak vysoké, tak nízké hodnoty mědi. Zvýšené hladiny mědi, která se do těla primárně dostává potravou, vedou ke vzniku reaktivních kyslíkových radikálů. Hlavními homeostázu zajišťujícími buňkami mozku jsou astrocyty. Za normálních okolností nepřevyšuje obsah volné mědi v buňce víc než jeden iont.(Rae, Schmidt et al. 1999) Tato nízká koncentrace je dána vazbou téměř veškeré mědi na metalothioneiny, glutathion a chaperony.(Inesi 2017) Úlohou **chaperonů** je nejen ochrana buňky před škodlivými účinky reaktivní volné mědi, ale i její přenos k cílovým proteinům.(Harrison, Jones et al. 2000, Palumaa 2013) Při vysokých koncentracích reaguje volná měď s α -synukleinem, zvyšuje jeho agregabilitu in-vitro a může se teoreticky podílet na rozvoji synukleinopatií.(Opazo, Barria et al. 2003, Sung, Rospigliosi et al. 2006, Wright, Wang et al. 2009, Binolfi, Rodriguez et al. 2010)

Měď je důležitým **kofaktorem dopamin beta-hydroxylázy** nutné pro produkci noradrenalinu. Ten je primárně produkován neurony v locus coeruleus, proto je v této oblasti koncentrace mědi fyziologicky nejvyšší.(Rihel 2018) Vysoký obsah mědi je v SN a hipokampu,(Dobrowolska, Dehnhardt et al. 2008) se snižující se tendencí pak v šedé a v bílé hmotě mozkové (1,6-6,5 mg/g vs. 0,9-2,5 mg/g).(Becker, Zoriy et al. 2005) Obsah mědi je významně vyšší v gliálních buňkách (zejména v okolí mozkových komor) než v neuronech.(Szerdahelyi and Kasa 1986)

Mozek získává měď přestupem ze séra dvěma způsoby. Buď prochází hematoencefalickou a hematolikorovou bariérou ve formě volného iontu(Choi and Zheng 2009) nebo využívá specifický transportér Ctr1. První zmíněný transport probíhá mnohem pomaleji, ale z něho získaná měď je pro mozkovou tkáň snáze použitelná. Transport přes Ctr1 probíhá buď v endotelových buňkách mozkových kapilár (exprimován na luminální straně) nebo cestou choroidálních plexů (exprimován na apikální membráně). Provedené studie naznačují, že ve vyzrálém mozku je přestup přes hematoencefalickou bariéru využíván k získávání mědi pro enzymatické procesy, zatímco přestup přes hematolikorovou bariéru spíše k vyloučení mědi zpět z mozku do krve.(Monnot, Behl et al. 2011) Ve fázi vývoje nezralého mozku je situace opačná a dominující vstupní cestou pro měď je právě hematolikorová bariéra.

Vylučování mědi z buněk závisí na funkci transmembránových proteinů – ATP7A a ATP7B. Ty umožňují její výstup z buněk a inkorporaci do měď vázajících enzymů. Za normálních okolností se proteiny vyskytují na membráně Golgiho aparátu, kam je měď z cytosolu přenášena. Při zvyšování obsahu mědi v cytosolu se oba transportní proteiny přesouvají z Golgiho aparátu do blízkosti buněčné membrány, kde zprostředkují vyloučení kovu z buňky.(Turnlund 1998, Gupta and Lutsenko 2009) Narušení funkce ATP7A způsobuje Menkesovu nemoc, mutace ATP7B WN. U Menkesovy nemoci nejsou buňky střevní sliznice schopny přenášet měď přes serózní membránu do krevní cirkulace, její sérové i tkáňové hladiny jsou nízké a dochází k poruše funkce enzymů vyžadujících měď jako

kofaktor.(Tumer and Moller 2010) Naopak u WN je narušeno vylučování mědi a ta se v těle patologicky kumuluje (viz Kapitolu 1.2.5.1).(Rodriguez-Castro, Hevia-Urrutia et al. 2015)

1.3.3 Mangan

Mangan je esenciálním prvkem(Takeda 2003, Erikson, Syversen et al. 2005), který je do těla vstřebáván ze stravy a inhalační cestou. Jeho intoxikací jsou ohroženi zejména průmysloví pracovníci v provozech, kde vzniká aerosol s manganem. Chronická expozice manganu nejen indukuje sekundární parkinsonský syndrom, ale je pravděpodobně také rizikovým faktorem pro rozvoj PN.(Gorell, Johnson et al. 1999)

Podobně jako ostatní uvedené kovy je mangan kofaktorem mnoha enzymů (například pyruvát dekarboxylázy, superoxiddismutázy nebo glutamin syntetázy), prostřednictvím kterých se podílí například na regulaci glykémie, imunitní odpovědi nebo syntéze neurotransmiterů. Mangan katalyzuje autooxidaci dopaminu, ovlivňuje hladiny GABA a glutamátu.(Chen, Bornhorst et al. 2018) Je potřebný také pro správnou funkci neuronů i glie.

Mangan se predispozičně **ukládá v oblasti bazálních ganglií**, zejména v globus pallidus a SN, kde indukuje neurodegeneraci a související motorické postižení (třes, poruchy řeči a stability stoje a chůze, psychóza). Akumulace manganu v bazálních gangliích byla zaznamenána také u pacientů s chronickým deficitem železa, což potvrzuje předpoklady o interakcích kovů založených mj. na sdílených transportérech. (Uchino, Noguchi et al. 2007, Tuschl, Mills et al. 2013)

Přítomnost manganu v buňce se zdá být induktorem programované buněčné smrti. Žádný z dosud objevených mechanismů **vstupu** manganu do buněk (DMT1, ZIP-8, transferinový receptor nebo kalciové kanály) se nejeví pro tento kov specifický. K **výstupu** z buněk užívá 3 odlišné transportní systémy – feroportin, Ca-ATPáza 1 a solubilní protein SLC30A10 (*Solute Carrier Family 30 Member 10*).(Myers, Nield et al. 2012) Homozygotní mutace posledního zmíněného transportéru vede k rozvoji familiárního manganem indukovaného parkinsonismu.(Tuschl, Mills et al. 2008, Quadri, Federico et al. 2012, Tuschl, Clayton et al. 2012, Lechpammer, Clegg et al. 2014) Postižení vykazují až dvacetinásobné hodnoty sérového manganu i při absenci zvýšeného příjmu. Hlavním problémem je tedy jeho retence. Depozita manganu se ukládají v mozku a játrech. Pacienti s manganem indukovaným parkinsonským syndromem se od klasické PN liší absencí dopaminergní odpovědi (byl však popsán efekt chelatační léčby na zmírnění příznaků(Quadri, Federico et al. 2012, Tuschl, Clayton et al. 2012)), disperznějším postižením mozku a příznaky nad rámec nervového systému (např. vývojové nebo reprodukční poruchy).

Specifickým příkladem vlivu manganu na mozek je **manganismus** indukovaný např. u uživatelů intravenózního metcathinonu (který vzniká oxidací pseudoefedrinu za použití

hypermanganu)(Herrero, Barcia et al. 2002, Fitsanakis, Zhang et al. 2008) nebo u pacientů s chronickým jaterním selháním nebo na plné parenterální výživě.(Hauser, Zesiewicz et al. 1994, Krieger, Krieger et al. 1995, Fitzgerald, Mikalunas et al. 1999, Bertinet, Tinivella et al. 2000, Aschner, Erikson et al. 2009)

1.3.4 Zinek

Zinek je esenciální stopový prvek, po železu druhý nejhojnější přechodný kov. V těle se nachází ve svalech, játrech a ve varlatech, ale nejvyšší koncentrace dosahuje v mozku, kde se odhaduje na 150 $\mu\text{mol/l}$, což představuje 10x vyšší hodnoty než v séru.(Mocchegiani, Bertoni-Freddari et al. 2005) Stejně jako ostatní zmíněné kovy je významným kofaktorem až 300 enzymů a metaloproteinů a je také složkou myelinu.(Nuzzo, Meneghini et al. 2002)

Role zinku v lidském těle je **ambivalentní**, závislá na jeho koncentracích. V nízkých koncentracích snižuje zinek precipitací meziproductů, shlukování A β a při jeho suplementaci bylo pozorováno zpomalení progresu AN.(Potocnik, van Rensburg et al. 1997) Ve vysokých koncentracích naopak zinek amyloidovou agregací zvyšuje,(Rezaei-Ghaleh, Giller et al. 2011) indukuje tvorbu kyslíkových radikálů a podílí se na rozvoji neurodegenerace.(Portbury and Adlard 2017) Akutní intoxikace zinkem, projevující se zejména poruchami čítí, chuti nebo čichu,(Taylor 1996, Taylor 1997) je velice vzácná a po odstranění expozice jsou následky toxicity zinku reverzibilní.(Ducray, Bondier et al. 2002)

Role zinku byla prokázána nejen při vzniku vaskulárního typu demence,(Mizuno and Kawahara 2013, Kawahara, Mizuno et al. 2014) ale také v **demyelinizaci**. V modelu experimentální autoimunitní encefalomyelitidy byl prokázán pozitivní vliv podávání antioxidantu zinek-metalothioneinu II na snížení mortality, zlepšení klinických příznaků i leukocytární infiltrace CNS.(Penkowa and Hidalgo 2001) Ačkoliv mechanismus efektu není plně znám, podkladem je nejspíše kompetitivní vztah zinku a ostatních kovů. Zvýšený příjem zinku snižuje vstřebávání mědi i železa. Při abnormálně vysokých hodnotách soupeří zinek o společné přenašeče se železem, které je nezbytné pro tvorbu a správnou funkci myelinu(Connor and Menzies 1996).

1.4 Role kovů ve fyziologickém stárnutí a v patofyziologických stavech

Železo je nejvíce prozkoumaným a diskutovaným kovem v lidském těle. V průběhu života dochází k jeho **fyziologickému ukládání** v predilekčních oblastech mozku (Ward, Zucca et al. 2014) jako jsou SN, putamen, globus pallidus, nucleus ruber, nucleus caudatus a nucleus dentatus. K nižší akumulaci dochází v bílé hmotě mozkových hemisfér a kortikálních oblastech. Nejnižší koncentrace železa v CNS jsou v pontu a prodloužené míše. (Reinert, Morawski et al. 2019)

Dle provedených studií se obsah železa v mozku během života zvyšuje. (Hallgren and Sourander 1958, Drayer, Burger et al. 1986) První známky depozit se objevují kolem 6. měsíce věku v globus pallidus, mezi 9.-12. měsícem v SN, mezi 18.-24. měsícem v nucleus ruber a mezi 3.-7. rokem věku v nucleus dentatus. Difuzní zvyšování koncentrací železa v mozku probíhá v několika odlišných fázích. Postupný nárůst se objevuje do třetí dekády, po které následuje mnohaleté období „klidu“, a další mírnější vrchol se znovu objevuje u osob kolem 60. roku věku (viz Obr.8). (Aquino, Bizzi et al. 2009, Wang, Li et al. 2014) Rychlost akumulace není ve všech hlubokých mozkových strukturách stejná. Příkladem je **locus coeruleus**, které s přibývajícím věkem kumuluje železo jen velmi pomalu, zatímco v SN dochází v čase k lineární progresi ukládání železa. (Bilgic, Pfefferbaum et al. 2012, Ward, Zucca et al. 2014) Při porovnání obou jader byly zjištěny podobné koncentrace neuromelaninu, feritinu i superoxididismutázy. Neuromelanin v locus coeruleus obsahoval vyšší množství mědi, což svědčí pro její vyšší mobilizaci v jádru. Přesný význam tohoto zjištění pro odlišnou dynamiku ukládání železa v SN a locus coeruleus však není znám. (Zecca, Stroppolo et al. 2004, Zucca, Bellei et al. 2006) U glií se vývoj ukládání železa liší podle jejich typu. U mikroglíí a astrocytů obsah železa s věkem koreluje, u oligodendrocytů se vliv stárnutí neprokázal. (Nnah and Wessling-Resnick 2018, Ashraf, Michaelides et al. 2019, Reinert, Morawski et al. 2019)

Zajímavostí je, že ženy mají v nucleus caudatus, thalamu a bílé hmotě mozkových hemisfér menší obsah feritinu než muži. (Bartzokis, Beckson et al. 1997, Bartzokis, Tishler et al. 2007) Tato skutečnost by teoreticky mohla mít vliv na méně častý výskyt a pozdější nástup neurodegenerace u žen (zejména PN a AN).

Akumulace železa v mikroglíích vede k zánětlivým změnám a produkci prozánětlivých cytokinů. Zánětlivé změny podporují další zadržování železa v buňkách. Jedná se tedy o uzavřený kruh potencující neurodegeneraci. (Fu, Jiang et al. 2015, Pamphlett, Bishop et al. 2018) Kromě neurodegenerativních onemocnění se s patologickým vlivem železa setkáváme také u kraniotraumat nebo cévních mozkových příhod. Při globální anoxii nebo lokální ischemii se zvyšuje produkce kyseliny mléčné, která snižuje schopnost transferinu vázat železo. (Millerot, Prigent-Tessier et al. 2005) Související změna buněčného prostředí navíc vede k uvolnění železa z jeho vazby na feritin, a to se může transformovat do reaktivní formy. U traumatických stavů může být oxidativní poškození potencováno také rozkladovými produkty hemu. (Daglas and Adlard 2018)

Faktorem ovlivňujícím akumulaci kovů ve vyšším věku může být narušení jejich homeostázy a metabolismu, zvýšená propustnost hematoencefalické bariéry nebo opakované záněty.(Kostial, Kello et al. 1978)

Teorie o vlivu kovů na neurodegeneraci vedly k experimentálnímu podávání **chelatační terapie**. In vitro studie, zaměřené na podávání desferrioxaminu (DFO-B) u AN, prokázaly snížení toxického působení železa, zinku a mědi na produkci patologického A β .(Rottkamp, Raina et al. 2001) V klinických studiích vedla chelatační léčba u některých pacientů s AN k významnému zpomalení postižení běžných denních aktivit.(Crapper McLachlan, Dalton et al. 1991) Navazující lékové studie však přinesly rozporuplné výsledky a léčba DFO-B se do běžné praxe nedostala. V současné době je DFO-B používán hematologu a hepatologu u stavů s přetížením železem (dědičná hemochromatóza, talasémie, myelodysplastický syndrom). Dalším nadějným chelátorem bylo antimykotikum *Clioquinol* (iodochlorhydroxyquin), které v porovnání s placebem zpomalovalo změny typické pro proces stárnutí a snižovalo sérovou hladinu A β u AN. Ukázalo se jako potenciálně prospěšné i u dalších neurodegenerativních onemocnění jako PN a HN. Jeho terapeutickému rozšíření zabránil složitý výrobní proces a neurotoxicita pozorovaná při dlouhodobějším užívání vyšších dávek vedoucí k subakutní optické neuropatii.(Meade 1975)

1.4.1 Parkinsonova nemoc

U PN je zvýšená koncentrace železa v oblasti SN je známým a mnoha studii potvrzeným nálezem. Kvantitativní studie uvádí zvýšení obsahu železa o 25-100% proti zdravým kontrolám.(Berg and Hochstrasser 2006) Semikvantitativní histochemické metody prokázaly zvýšený výskyt depozit železa v neuronech a glii nejen v SN, ale také v putamen a globus pallidus. V depozitech výrazně převažuje na feritin bohatá mikroglie. Na základě spektroskopických vyšetření byla navržena korelace mezi kumulací železa a progresí PN.(Dexter, Wells et al. 1989, Riederer, Sofic et al. 1989) In vivo zobrazovací metody (magnetická rezonance a transkraniální sonografie) bohužel neumožňují dostatečnou kvantifikaci obsahu železa k potvrzení této teorie.

Existuje několik mechanismů, kterými se železo stává u PN pro mozek **toxickým**. V in vitro studiích bylo prokázáno, že železitý ion katalyzuje konverzi α S z konformace z α -helixu do β -skládaného listu, který tvoří Lewyho tělíška.(Wan, Jin et al. 2017, Xiao, Chen et al. 2018) Při vysoké expozici železa a převýšení saturačních schopností feritinu a neuromelaninu v neuronech a gliích dochází ke kumulaci reaktivních forem železa a rozvoji neurotoxicity s vážnější neuronální ztrátou.(Salvador, Uranga et al. 2010) Dle zvířecího modelu PN jsou dalšími faktory, ovlivňující intracelulární hladinu železa, zvýšená aktivita DMT1 nebo snížená feroxidázová aktivita ceruloplasminu.(Salazar, Mena et al. 2008)

I přes všechny popsané negativní aspekty kumulace reaktivních forem železa v mozkové tkáni, působí vyšší hodnoty sérového železa při potenciálním rozvoji PN spíše protektivně, což potvrzuje ambivalentní působení většiny kovů.(Pichler, Del Greco et al. 2013) Vysvětlením toho jevu je funkce železa jako kofaktoru mnoha enzymů, včetně tyrosin hydroxylázy, hlavního enzymu syntézy dopaminu.

Multicentrické randomizované studie **FAIR-PARK I a II** studovaly efekt chelatační léčby *deferipronem* (DFP) u pacientů s PN. Předběžné výsledky nasvědčují, že chelát snižuje regionální siderózu v SN a zpomaluje progresi motorického postižení.

1.4.2 Wilsonova nemoc

Při narušení transmembránového proteinu ATP7B, jehož funkcí je: 1) přenos mědi z Golgiho aparátu hepatocytů a její inkorporace do apoceruloplasminu; 2) exkrece mědi do žluče, dochází ke kumulaci mědi v hepatocytech. Hromadí se měď je v mitochondriích zpočátku pufrována **thioly** (Yin, Sancheti et al. 2012), organickými sloučeninami síry odvozenými od alkoholu, které se ochotně slučují s těžkými kovy. Při překročení jejich kapacity dochází k poškození mitochondriální membrány a dýchacího cyklu s neschopností tvořit ATP. Po rozpadu mitochondrií se měď šíří do okolí a zvyšuje oxidativní stres. Postupně se rozvíjí steatóza a fibróza, která může vygradovat až do jaterní cirhózy.(Scheiber, Bruha et al. 2017) Poškozené hepatocyty uvolňují měď do krve, odkud se dostává k dalším orgánům. Při akutním jaterním selhání dochází k sekundární hyperamonémii.(Ferenci, Litwin et al. 2015) Amoniak volně prostupuje hematoencefalickou bariérou do mozku, kde narušuje Krebsův cyklus a navazující metabolické procesy poškozují neurony i podpůrné buňky.(Ott, Clemmesen et al. 2005, Bosoi and Rose 2009)

Bylo prokázáno, že ATP7B je exprimován také v mozku, kde její nedostatek působí odlišným mechanismem než v hepatocytech.(Roberts, Schilsky et al. 2008, European Association for Study of 2012) V mozku je protein zakotven na povrchu astrocytů a reguluje buněčný eflux, včetně mědi a železa, čím zabraňuje jejich nadměrnému hromadění v buňkách.

WN není jen poruchou metabolismu mědi, protože její metabolismus je silně provázán také s železem. Železo a měď u WN spolu na buněčné úrovni interagují mnoha odlišnými mechanismy.(Hayashi, Yano et al. 2006, Motonishi, Hayashi et al. 2006, Hayashi, Fujita et al. 2009) Ceruloplasmin je také feroxidázou nutnou pro transport železa.(Osaki, Johnson et al. 1971, Attieh, Mukhopadhyay et al. 1999) Hypoceruloplazminémie může vést k systémové akumulaci železa.(Shiono, Wakusawa et al. 2001)

Kromě často udávané role v metabolismu mědi a železa se **ceruloplasmin**, jakožto koenzym dopamin beta-hydroxylázy, podílí také na regulaci neurotransmiterů (např. noradrenalinu).(Pandey,

Sreenivas et al. 1981) Nedostatek ceruloplasminu v mozku, kde se podílí na oxidaci katecholaminu, se může podílet na rozvoji PN či jiné neurodegenerace.(Floris, Medda et al. 2000)

1.4.3 Neurodegenerace s akumulací železa v mozku

U NBIA dochází ke kumulaci kovů zejména v bazálních gangliích (viz kapitolu 1.2.5.2), mechanismus a postižené buňky se liší.

Pantotenátkináza je zodpovědná za fosforylaci pantothenátu a produkt této reakce následně reaguje s cysteinem. Při její mutaci u **PKAN** dochází k nárůstu cysteinu, který ve spojení s železem produkuje volné radikály, což vede k poškození buněk, předilekčně v globus pallidus.(Dansie, Reeves et al. 2014) Histologická vyšetření potvrdila ložiskově korelující přítomnost depozit železa. Z chelátorů se u PKAN zkouší například deferipron, deferoxamin a deferasirox.(Gomber, Saxena et al. 2004) Zvláště nadějných se zdá být deferipron, který dokáže prostoupit hematoencefalickou bariérou a vychytávat v mozku železo.(Olivieri, Brittenham et al. 1998, Boddaert, Le Quan Sang et al. 2007) V dosud provedených studiích byl jeho lékový profil shledán jako bezpečný.(Zorzi, Zibordi et al. 2011, Cossu, Abbruzzese et al. 2019, Klopstock, Tricta et al. 2019)

U **aceruloplasminémie** hodnoty železa v mozku obvykle překračují normu 5-10 násobně.(Morita, Ikeda et al. 1995) Její kumulaci je nejvíce postižena mikroglie, zejména astrocyty, které nejsou schopné efluxu železa k jeho další utilizaci neurony.(Roberti Mdo, Borges Filho et al. 2011, Marchi, Busti et al. 2019) Efekt chelatační terapie u aceruloplasminémie byl hodnocen pouze v několika studiích a přinesl rozporuplné výsledky.(Miyajima, Takahashi et al. 1997, Yonekawa, Okabe et al. 1999, Hida, Kowa et al. 2010) Deferoxamin a deferasirox normalizují hodnoty sérového feritinu a u některých pacientů prokázala kvantitativní MR redukci depozit železa o 20-30 %.(Miyajima, Takahashi et al. 1997, Pan, Tang et al. 2011) Zdá se, že z chelatační léčby profitují zejména pacienti odhalené v presymptomatické fázi neurologického postižení. (Chen, Chen et al. 2008, Vroegindeweij, van der Beek et al. 2015)

U neuroferitinopatie je narušena vazebná schopnost feritinu, což vede ke zvyšování koncentrací Fe^{2+} a volného železa, které přispívá ke vzniku volných radikálů.(Curtis, Fey et al. 2001, Vidal, Ghetti et al. 2004, Levi and Finazzi 2014) Kromě oxidativního stresu se na poškození neuronů podílí i mitochondriální dysfunkce.(Mancuso, Davidzon et al. 2005, Chinnery, Crompton et al. 2007, Storti, Cortese et al. 2013) Efekt chelatační terapie ani venesekcí nebyl prokázán.(Mancuso, Davidzon et al. 2005, Chinnery, Crompton et al. 2007, Kubota, Hida et al. 2009, Storti, Cortese et al. 2013)

1.4.4 Další neurodegenerativní onemocnění s akumulací kovů

Alzheimerova nemoc

Genetické studie prokázaly, že **mutace genů zapojených v metabolismu železa** zvyšují riziko rozvoje AN.(Lumsden, Rogers et al. 2018) Pacienti s AN s časným počátkem vykazují vyšší hodnoty železa v mozkové tkáni než ti, u kterých se příznaky objevují později.(Bartzokis, Sultzer et al. 2000) Ke zvýšenému ukládání železa u pacientů s AN dochází jak v nucleus caudatus, tak v nerozpustných amyloidových plakách i v neurofibrilárních klubkách, kde se navíc kombinují s depozity mědi a zinku.(Lovell, Robertson et al. 1998) Paradoxně jiné části mozku pacientů s AN mohou patologickou redistribucí kovů do oblasti bazálních ganglií, temporálních laloků a hipokampů trpět jejich nedostatkem.

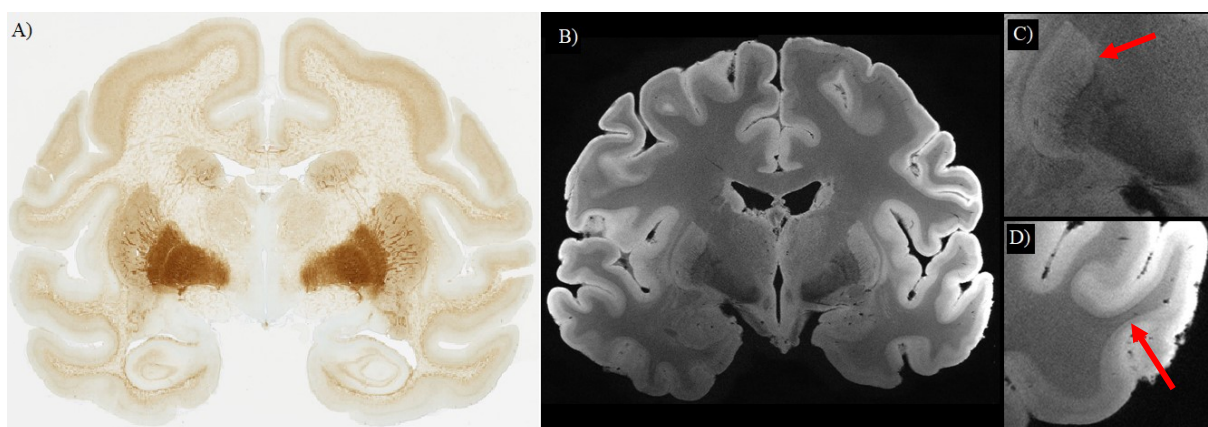
Huntingtonova nemoc

Mutovaný gen **huntingtin** působí v embryonálních kmenových buňkách jako regulátor železa a podílí se tedy na řízení jeho metabolismu.(Schulte and Littleton 2011) Jeho dysfunkce vede k nadměrnému ukládání železa v nejvíce postižených oblastech (striatum, kortex).(Bartzokis, Cummings et al. 1999, Vymazal, Klempir et al. 2007, van den Bogaard, Dumas et al. 2013, Niu, Ye et al. 2018)

1.5 Zobrazovací metody ke stanovení kovů v centrální nervové soustavě

Nejcitlivější neinvazivní metodou hodnocení kumulace kovů v mozku zůstává magnetická rezonance. Transkraniální sonografie, která si v posledních letech našla uplatnění v diagnostice PN i jiných neurodegenerativních onemocnění, umožňuje detekovat změny echogenity mozkového parenchymu. Podklad změn echogenity mozkové tkáně není jasný, ale podle některých teorií odráží změny v koncentraci kovů.(Bartova, Skoloudik et al. 2008, Berg, Godau et al. 2008, Walter, Dressler et al. 2008, Walter and Skoloudik 2014)

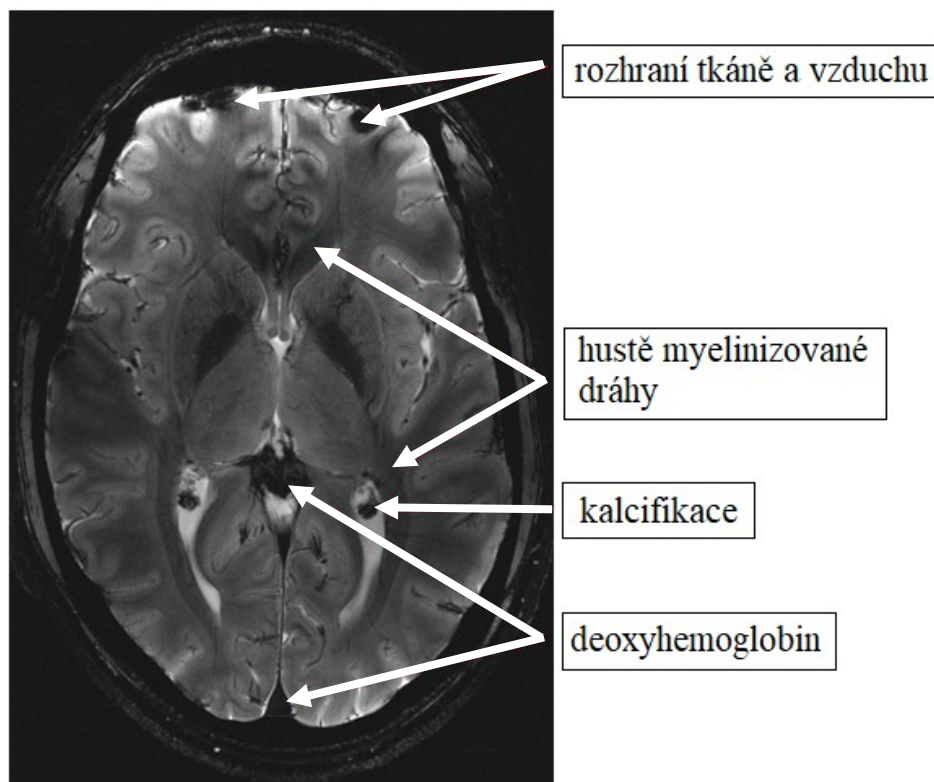
V lidském mozku je však obsaženo nejen mnoho kovů, ale i další látky s magnetostatickým účinkem, např. myelin či deoxyhemoglobin, které ovlivňují MR signál a mohou být zdrojem desinterpretací.(Duyn 2013, Duyn and Schenck 2017) Většina látek v lidské těle je minimálně diamagnetická a významně tedy magnetické pole neovlivňuje. Oproti tomu kovy jsou nejčastěji paramagnetické, a tedy vykazují magnetizaci po umístění do magnetického pole skeneru, čímž způsobují lokální nehomogenity magnetického pole. Většina depozit kovů zkracuje T2, T2* a/nebo T1 relaxační časy, což vede k zvýšení signálu na T1 a snížení signálu na T2/T2* vážených obrazech.(Kanda, Nakai et al. 2016)



Obr. 8– A) koronální řez s histochemickým barvením na železo (*Chlorocebus Aethiops* DAB-enhanced Pearls staining, <http://brainmaps.org>); B+C+D): korelace hyposignálních změn a intenzity barvení na železo v mozku na post-mortem skenu. T2* vážená sekvence gradientního echa (GRE): B) koronární řez mozkiem; C) detail nucleus lentiformis (zevně světlejší putamen s pruhovitými hypointenzitami odpovídajícími svazkům myelinizovaných vláken s vysokým obsahem železa (šipka), mediálně tmavší globus pallidus); D) detail bílé a šedé hmoty s jejich hyposignálním rozhraním odpovídajícím vyšší koncentraci železa v subkortikálních vláčkách (šipka) (skenováno na 7T MR přístroji v BUFF MDC, Berlin)

Hlavní formy nehemového železa, které jsou v mozku v dostatečném množství pro ovlivnění MR signálu, jsou feritin a hemosiderin. Přestavují 33-88 % všeho nehemového železa v mozku.(Haacke, Cheng et al. 2005, Dusek, Dezortova et al. 2013) Míra hyposignálních změn na T2

a T2* vážených obrazech koreluje s obsahem železa (intenzitou histochemického barvení) v bazálních gangliích a některých dalších strukturách (viz Obr. 8).(Chen, Hardy et al. 1989, Chen, Hardy et al. 1993) Jiné T2/T2* hyposignální změny nejsou způsobeny železem, ale obsahem myelinu, vody, kalcia, deoxyhemoglobinem a susceptibilních artefaktů v okolí vzduchových dutin kalvy(Dusek, Dezortova et al. 2013) (viz Obr. 9).



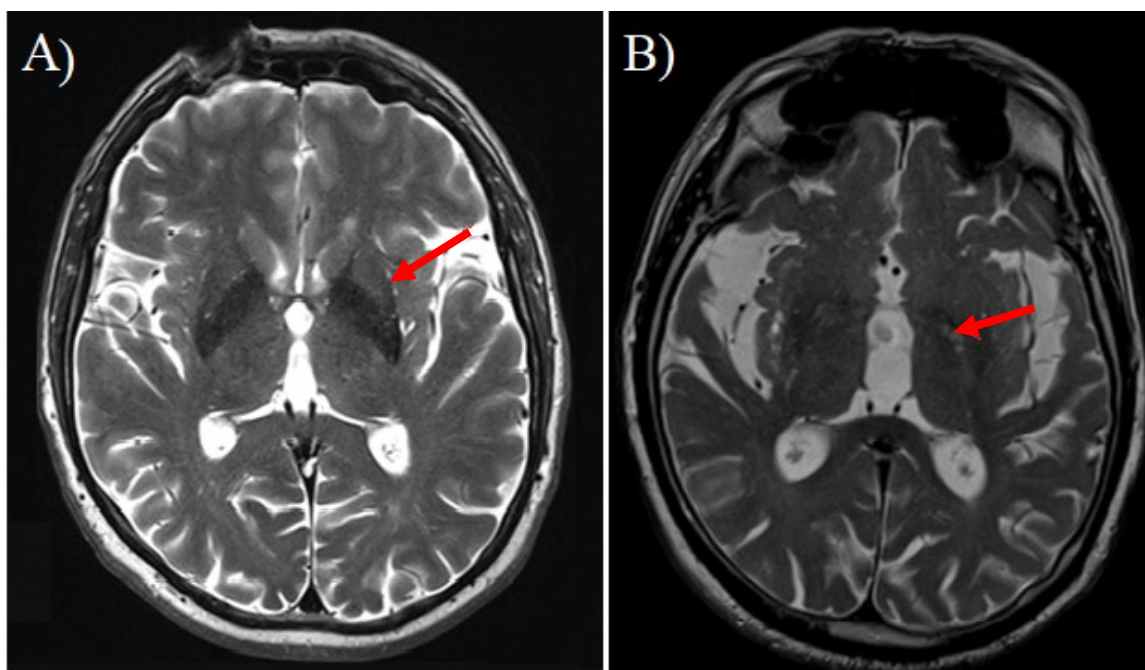
Obr. 9 – Zdroje hyposignálních změn na MR na T2 váženém obraze magnetické rezonance (skenováno na 7T MR přístroji v BUFF MDC, Berlin)*

Míra změn, které působí železo na MR, je ovlivňována kromě jejich koncentrace i dalšími faktory, mj. kolísáním magnetismu v závislosti na oxidačním stavu(Dietrich, Levin et al. 2017) a velikostí částecek železa (clustering effect).(Tanimoto, Pouliquen et al. 1994, Vymazal, Brooks et al. 1996, Tanimoto, Oshio et al. 2001) Pro detekci nehomogenit magnetického pole jsou citlivější techniky odvozené od gradientního echa, T2* vážené a susceptibilně vážené zobrazování (SWI)(Yao, Li et al. 2009, Langkammer, Krebs et al. 2010) a použití silnějšího magnetického pole. Ve vodě rozpustné formy železa zkracují i T1 relaxační čas, což je například patrné jako hypersignální změny v T1 vážených obrazech v určitém stádiu vývoje cerebrálních hemoragií.(Ginat and Meyers 2012)

Konvenční MR bývá u pacientů s PN obvykle normální. Její význam spočívá zejména ve vyloučení jiných neurodegenerativních onemocnění(Hotter, Esterhammer et al. 2009, Mahlknecht,

Hotter et al. 2010) či strukturálních příčin postihujících bazální ganglia (cévní či demyelinizační léze, normotenzní hydrocefalus, manganismus). Až při použití R2* a QSM bylo zjištěno, že typickým nálezem u PN je zvýšené R2* relaxivity i susceptibility SN podmíněné zvýšeným obsahem železa. Navazující komparativní studie prokázaly vyšší senzitivitu a lepší korelaci změn s klinickým obrazem při použití QSM, která by mohla být používána jako biomarker železem indukovaných změn u PN.(Du, Liu et al. 2016) Na MR senzitivní k neuromelaninu je u PN s vysokou přesností snižená velikost i signál SN(Castellanos, Fernandez-Seara et al. 2015) a překvapivě i signál locus coeruleus.(Sasaki, Shibata et al. 2006)

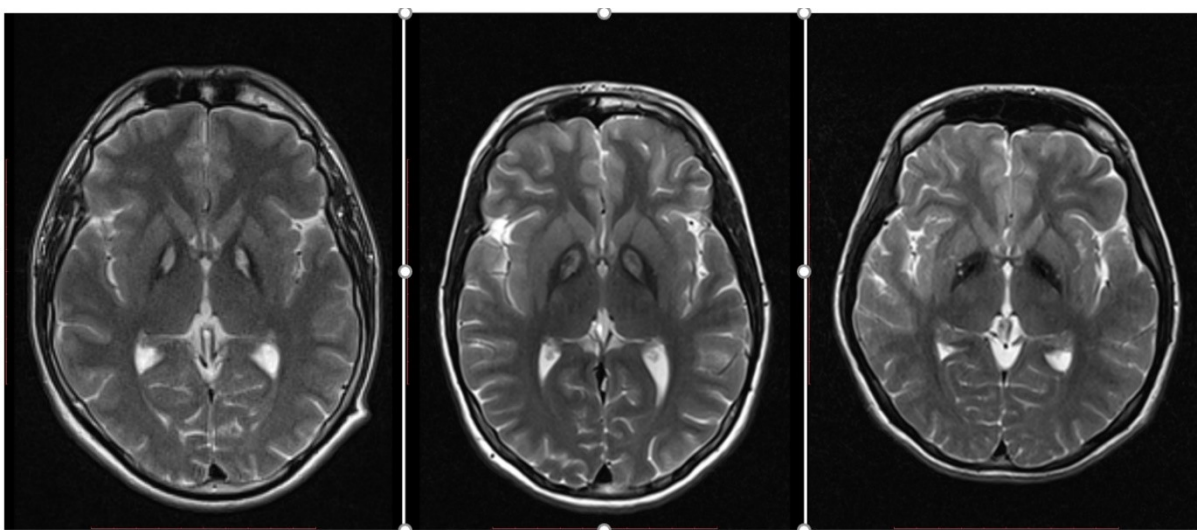
Pacienti s **MSA i PSP** mají na MR v oblasti putamen hypointenzity, u kterých byla vyšetřením SWI potvrzena korelace se zvýšeným obsahem železa v mozkové tkáni.(Lee and Baik 2011, Han, Lee et al. 2013) U MSA-P se železo v putamen a pulvinaru thalami ukládá více než u pacientů s PN a zdravých subjektů. Depozita železa v SN byla u MSA-P a PN srovnatelná a výrazně vyšší než u kontrol.(Wang, Butros et al. 2012) U pacientů s PSP bývá v porovnání s PN snížený SWI signál v nucleus ruber a dentatus(Meijer, van Rumund et al. 2015), v jedné studii i v putamen.(Meijer, van Rumund et al. 2015) Při porovnání pacientů s atypickými parkinsonskými syndromy jsou patologické kumulace železa častější a závažnější u PSP. Zatímco u MSA-P je primárně postiženo putamen, u PSP jsou změny v nucleus ruber, SN, nucleus caudatus, globus pallidus i v thalamu(Han, Lee et al. 2013)(viz Obr.10).



Obr. 10 – Zobrazení železa u atypických parkinsonských syndromů: A) hypersignální putaminálním lem u multisystémová atrofie; B) symetrická akumulace feritinu v globus pallidus u progresivní supranukleární obrny na T2 vážených obrazech (skenováno na 3T MR přístroji v IKEM, Praha)

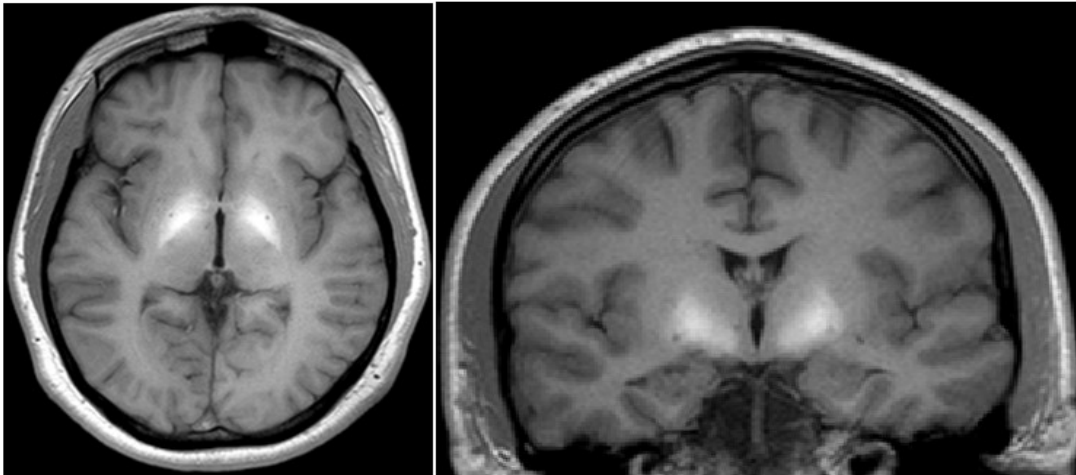
Uvedené rozdíly v kumulaci železa u APS na MR neodpovídají echogenním změnám na TCS. I přes na MR popisovanou kumulaci železa v SN u PSP, bývá echogenita dané oblasti u pacientů s touto diagnózou v normě. U pacientů s MSA je stanovení korelace MR depozit pro inkonzistentní TCS nálezy obtížně hodnotitelné (viz Kapitulu 1.5.2.1).

Konzistentně udávaných MR nálezem u **PKAN** je „oko tygra“ (viz. Obr.11), na T2 obrazech viditelné hypersignální změny léze globus pallidus obklopené hyposignálním okolím. Centrální hyperintenzita odráží lokální gliózu v globus pallidus a okolní hypointenzita depozita železa.(Savoiaro, Halliday et al. 1993) V počátečních fázích onemocnění musí být typický obraz přítomen, ale s progresí onemocnění se vyvíjí.



Obr. 11 – Obraz PKAN na T2 vážených obrazech magnetické rezonance, na prvních dvou snímcích příznak „tygřího oka“ (skenováno na 3T MRI přístroji v IKEM, Praha)

Mangan je vysoce paramagnetický a jeho kumulace je zdrojem zvýšeného signálu v T1 váženém obraze, typicky v globus pallidus, SN nebo v hypothalamu(Newland, Ceckler et al. 1989) (viz Obr.12). Zajímavostí je, že deficitem železa vyvolaná zvýšená absorpce manganu ze střeva nevede k uvedeným hypersignálním změnám pozorovaným při intoxikaci manganem.(Kim Y 2005) Také manganem podmíněný zvýšený signál ve striatu na T1 váženém obraze po proběhlé ischemii má pouze přechodný charakter s normalizací v čase.(Fujioka, Taoka et al. 2003)

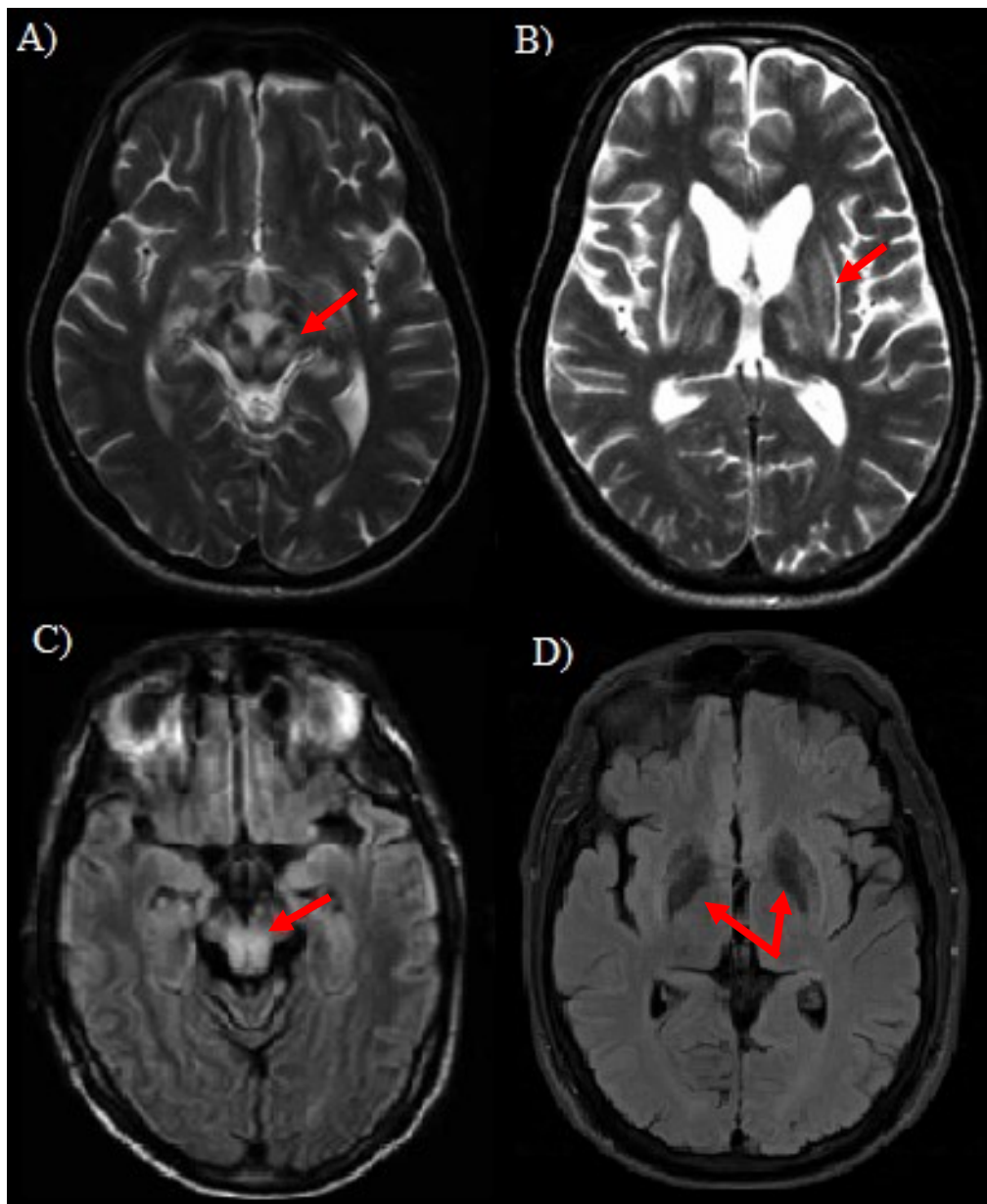


Obr. 12 – Zvýšený signál v T1 váženém obraze podmíněný depozity manganu v globus pallidus u pacienta s manganismem způsobeným intravenózním užíváním methcatinonu (skenováno na 3T MR, Ústav medicínského výzkumu, Tbilisi)

Měď je kovem s relativně malým paramagnetickým vlivem. Jeho akumulace pravděpodobně nevede k přímým signálovým změnám na MR.(Dusek, Roos et al. 2015)

U WN jsou nejčastěji popisovanými nálezy na MR mozku difuzní hypersignální změny a příznak pandy (*panda sign*; viz. Obr.13) podmíněný hypointenzitami nucleus ruber a SN obklopenými hyperintenzním mezencefalem. Zmíněné T2 hyperintenzity nejspíše podmiňuje edém nebo glióza.(Roh, Lee et al. 1994, Kim, Kim et al. 2006, Sinha, Taly et al. 2007) Hypointenzity na T2 vážených obrazech jsou podmíněny kumulací jak mědi, tak železa, což bylo potvrzeno v post mortem studiích.(Cumings 1948, Litwin, Gromadzka et al. 2013) Záchyt příznaku pandy je ve skutečnosti relativně raritní(Sinha, Taly et al. 2006) a ukázalo se, že je přítomný i u dalších onemocnění.(Prayer, Wimberger et al. 1990, Magalhaes, Caramelli et al. 1994, King, Walshe et al. 1996, Litwin, Gromadzka et al. 2013) V některých studiích byla naznačena odlišnost MR nálezů v závislosti na pohlaví, která zvažovala nejen hormonální podíl, ale také rozdílné hladiny železa. Nálezy u mužských pacientů s WN byly těžší s výraznější atrofií, zatímco u žen bylo častěji pozorováno ložiskové postižení putamen.(Litwin, Gromadzka et al. 2013)

Hlavní limitací zobrazování jednotlivých kovů je nízká specifita MR, která detekuje kovy pouze nepřímo díky jejich vlivu na relaxační časy nebo susceptibilní vlastnosti tkáně, a jejich vzájemné interakce jsou jejich vzájemné interakce (hromadění jednoho kovu často vede k poruše absorpce jiných, a naopak například nedostatek železa zvyšuje expresi nespecifických transportérů a vede ke zvýšenému vstřebávání manganu, nikl nebo olova).(Knopfel, Zhao et al. 2005, Bressler, Olivi et al. 2007)



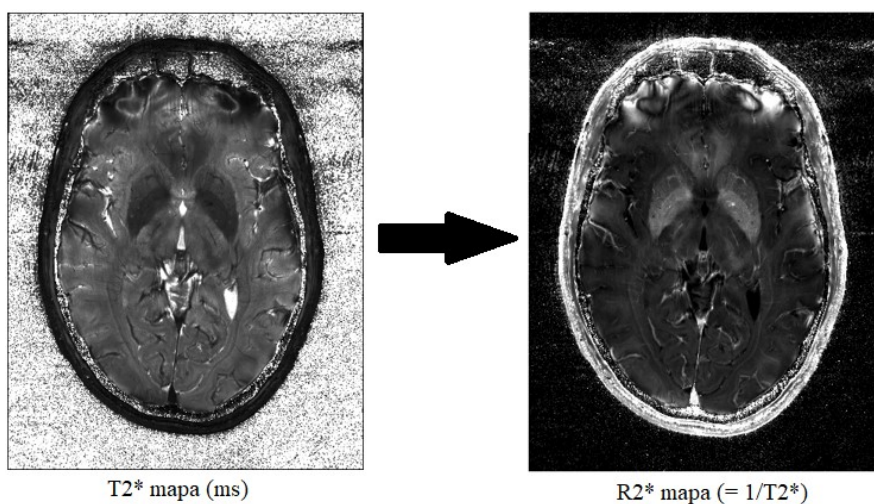
Obr. 13 – Typický nález u Wilsonovy nemoci: A) panda sign v mezencefalu na T2 váženém obraze; B) hypersignální caudrum na T2 váženém obraze; C) hyperintenzity v tectu mezencefala na FLAIR; (skenováno na 1.5T MRI, VFN, Praha) D) hypointenzity bazálních ganglií na FLAIR (skenováno na 3T MRI, VFN, Praha)

1.5.1 Kvantitativní metody magnetické rezonance

Pro kvantitativní hodnocení obsahu kovů, zejména železa, ve tkáních byla vyvinuta řada MR technik, mezi nejčastěji používané patří měření relaxačních časů a susceptibility. Kvantifikace obsahu železa v mozkových strukturách je použitelná jako biomarker neurodegenerativních onemocnění a je užitečnou metodou ke kontrole efektu chelatační terapie.

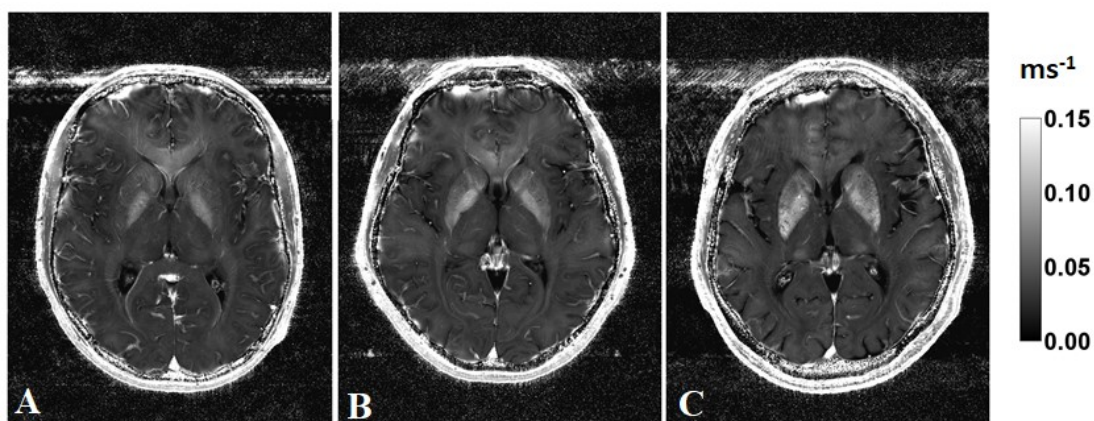
MR relaxometrie

Relaxometrie je kvantitativní metoda, která používá opakovaného stanovení MR signálu při změně parametrů (např. echo času nebo inverzního času) pulzní sekvence ke stanovení relaxačních časů (T_1 , T_2 , a T_2^*) v dané tkáni. Často se používají z nich odvozené hodnoty, tzv. relaxivity R_1 , R_2 , R_2^* , které jsou inverzními hodnotami k relaxačním časům (viz Obr. 14).



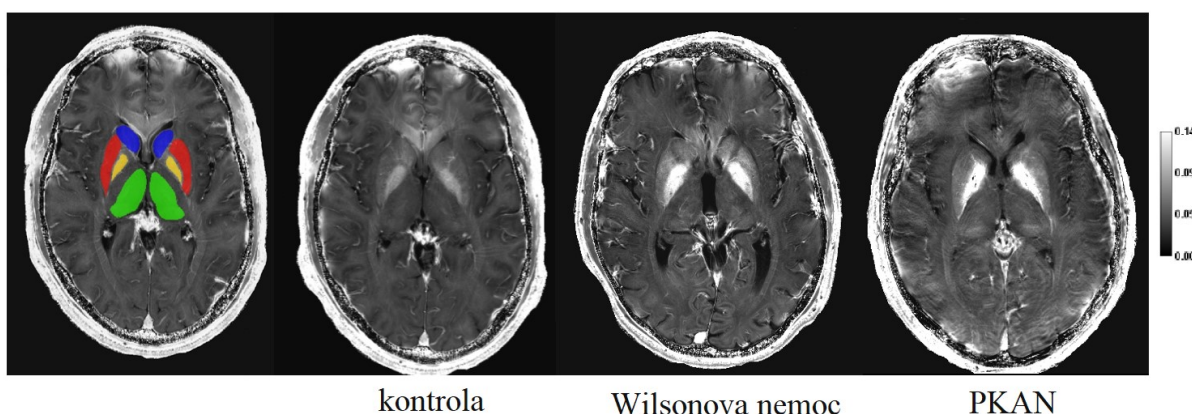
Obr. 14 – T_2^ a R_2^* mapy zdravého mozku (skenováno na 7T MR přístroji v BUFF MDC, Berlin)*

R_2^* mapování je možné použít ke sledování depozit železa **při fyziologickém stárnutí** (viz Obr.15). V průběhu života kumulace železa v mozku, s maximem v bazálních gangliích, narůstá a nejvyšších koncentrací dosahuje v (Hallgren and Sourander 1958) pallidus. Vysoké koncentrace jsou také v SN, putamen, nucleus caudatus a nucleus dentatus. Obsah železa v thalamu se zvyšuje asi do 35 roku věku, poté dochází naopak k jeho mírnému poklesu. Nejnižší koncentrace železa jsou v bílé a šedé hmotě mozkových hemisfér.(Hallgren and Sourander 1958, Drayer, Burger et al. 1986, Ghadery, Pirpamer et al. 2015, Baranovicova, Kantorova et al. 2017)



Obr. 15 – R_2^ mapa (v ms^{-1}) dokumentující narůstající depozita železa v bazálních gangliích ve zdravém mozku: A) v 18 letech; B) v 38 letech; C) v 68 letech (skenováno na 7T MR přístroji v BUFF MDC, Berlin)*

Hodnoty R2 a R2* jsou zvyšovány přítomností nehemového železa. Silná korelace mezi R2 a lokální koncentrací železa v šedé hmotě byla potvrzena i výsledky histologických vyšetření v mnoha studiích in vitro i in vivo. (Bartzokis, Mintz et al. 1994, Bartzokis, Sultzer et al. 1994, Bartzokis and Marder 1995, Bartzokis, Beckson et al. 1996, Bartzokis, Beckson et al. 1997, Bartzokis, Cummings et al. 1999, Bartzokis, Sultzer et al. 2000, Bartzokis and Tishler 2000) Korelace pro bílou hmotu je slabší, což je nejspíše způsobeno nízkým obsahem železa a vyšším obsahem vody a tuků. (Whittall, MacKay et al. 1997) Právě vliv obsahu vody na R2 ztěžuje jeho použití u neurologických onemocnění, která jsou spojena s její zvýšenou kumulací, například u zánětlivých změn, gliózy, otoku nebo lokální reakce na ztrátu neuronů (viz Obr.16).

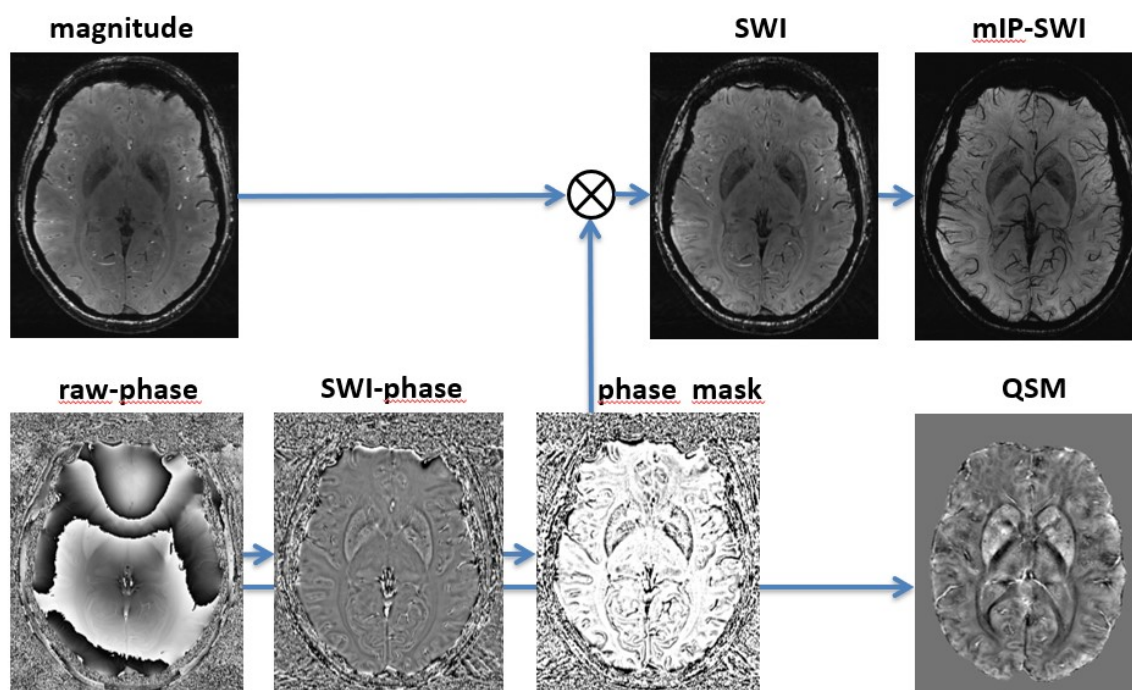


Obr. 16 – R2 mapa (v ms⁻¹) dokumentující rozdíly v obsahu železa na MR mozku u zdravého mozku, Wilsonovy nemoci a PKAN (skenováno na 7T MRI přístroji v BUFF MDC, Berlin)*

SWI/QSM (Susceptibility-Weighted Imaging/Quantitative Susceptibility Mapping)

SWI je MR technika využívající ke zlepšení kontrastu rozdílné susceptibility jednotlivých vyšetřovaných tkání. Magnetická susceptibilita je fyzikální veličina odrážející rozsah, v jakém je materiál magnetizován aplikovaným magnetickým polem. Ačkoliv je **magnetická susceptibilita** zdrojem artefaktů při vyšetření MR, poskytuje při správném zpracování specifické informace o struktuře a funkci zobrazované tkáně. Výsledný obraz vzniká kombinací magnitudového a fázového obrazu gradientního echa. Při vytváření SWI je fázový obraz nejdříve filtrován a poté transformován do fázové masky, která je velikostně několikrát znásobena, čímž se vytvoří zvýšený kontrast mezi tkáněmi s různou susceptibilitou (viz Obr.12). Oproti T2* váženému obrazu je možno ve fázovém obrazu rozlišit paramagnetické a diamagnetické látky, které generují různý fázový posun frekvence rotace protonů v magnetickém poli. Diamagnetické látky (např. kalcifikace) mají negativní a paramagnetické látky (např. krvácení, gadolinium nebo železo) pozitivní susceptibilitu. (Halefoglou and Yousem 2018)

SWI našla uplatnění při vyšetřování žilních abnormit, zobrazení intracerebrálních krvácení, tumorů, cévních mozkových příhod, poranění mozkových tkání a minerálových depozit, mj. slouží k odlišení kalcifikací od microbleedingu.



Obr. 17 – Vztahy jednotlivých zobrazovacích sekvencí magnetické rezonance

Sama o sobě však SWI neposkytuje možnosti kvantitativního hodnocení magnetické susceptibility, proto byla vyvinuta metoda kvantitativního mapování susceptibility (QSM). QSM počítá z fázového obrazu pokročilými matematickými metodami susceptibilitu každého voxelu (viz. Obr. 17). Mikroskopická magnetická pole uvnitř hodnoceného voxelu jsou výrazně ovlivňována nejen obsahem para a diamagnetických molekul, ale i mikrostrukturou dané tkáně, uspořádáním organel a buněčných prostorů v ní. (Wang and Liu 2015)

QSM se jeví jako vhodný nástroj ke kvantitativnímu hodnocení obsahu železa v mozku komplementární k R2* relaxometrii a je užívána při vyšetřování onemocnění spojených s jeho kumulací (Alzheimerovy nemoci, roztroušené sklerózy, Parkinsonovy nebo Wilsonovy nemoci). (Cosottini, Frosini et al. 2014)

Limitací QSM je její obtížná reprodukovatelnost, protože fázový posun je závislý na použitém přístroji a hodnoty susceptibility jsou závislé na metodě rekonstrukce. Interpretace výsledků může být narušena také konkurenčními účinky odlišných signálových zdrojů, hluboké mozkové struktury obsahují železo i vysoký obsah myelinu, které působí opačné změny susceptibility. Ačkoliv QSM nabízí možnost kvantifikace susceptibility, není schopna sama rozlišovat její různé zdroje. (Liu, Buch et al. 2017, Halefoglu and Yousem 2018)

1.5.2 Transkraniální sonografie

TCS, ultrazvukové zobrazení intrakraniálních struktur v B-módu, je dostupná, časově a ekonomicky nenáročná zobrazovací metoda. Její výhodou je možnost vyšetření i hůře spolupracujících pacientů. Standardně je hodnocena oblast bazálních ganglií a struktury mozkové kmene (nuclei raphe, SN, nucleus ruber). Zobrazitelný a hodnotitelný je i komorový systém, mozeček, thalamus nebo inzula.(Walter, Behnke et al. 2007)

V počátku svého klinického využití byla TCS používána primárně v diferenciální diagnostice PN a esenciálního tremoru (u kterého je echogenita SN obvykle v normě).(Stockner, Sojer et al. 2007, Doepp, Plotkin et al. 2008) Postupem času se však indikace vyšetření významně rozšířily a v současné době je TCS užívána nejen k diagnostice dalších neurodegenerativních nebo psychiatrických onemocnění,(Becker, Becker et al. 1995, Becker, Berg et al. 2001, Mijajlovic 2010, Drepper, Geissler et al. 2018) ale také k posuzování možného rizika rozvoje neurologického onemocnění u zdravých osob.(Berg, Seppi et al. 2010)

Při TCS hodnotíme **echogenitu**, tedy schopnost tkáně vytvářet ozvěnu ultrazvukovému vlnění. Pro její vznik a intenzitu je zásadní rozdíl v rychlostech šíření ultrazvukové vlny v hodnocené oblasti a okolních tkáních či poměr mezi velikostí objektu a délkou ultrazvukové vlny. V patogenezi zvýšené echogenity mozkových struktur u neurodegenerativních onemocnění je zvažováno několik mechanismů. Například ukládání depozit kovů, glióza, oxidativní stres nebo lokální zánětlivé změny.(Behnke, Berg et al. 2003, Berg, Merz et al. 2005, Ouchi, Yoshikawa et al. 2005, Sadowski, Szlachta et al. 2012) Nejvíce diskutovanou teorií, založenou na výsledcích studií zaměřených na SN u pacientů s PN, je ukládání **depozit železa**.(Berg, Roggendorf et al. 2002, Zecca, Berg et al. 2005)

Postmortální neuropatologická vyšetření mozků zdravých osob prokázala pozitivní korelaci mezi oblastí zvýšené echogenity v SN a koncentrací železa a feritinu. Negativní korelace byla mezi echogenitou a neuromelaninem.(Zecca, Berg et al. 2005) Depozita železa jsou sama o sobě k ovlivnění ultrazvukových vln příliš malá. Mohou však indukovat zobrazitelné změny vlastností nebo uspořádání okolních buněk.(Sadowski, Szlachta et al. 2012) Tento předpoklad by byl v souladu s výsledky laboratorních pokusů na animálních modelech, u kterých se zdá být viabilita mozkové tkáně po aplikaci železa zásadním faktorem.

První TCS animální studie(Berg, Grote et al. 1999) byla prováděna vstříknutím rozdílných roztoků (volného železa, feritinu, chelátu nebo zinku a pufru pro kontrolní skupinu) do SN živých potkanů, kteří byli usmrceni s odstupem týdne a sonografické vyšetření bylo provedeno post mortem. Na základě množství podaného železa bylo pozorováno zvýšení echogenity, nejdříve pouze v oblasti SN (kam byl roztok primárně injikován), při vyšších koncentracích i v ostatních částech mozku a při nejvyšších v celé hemisféře. Echogenita se však zvýšila pouze po podání roztoku volného železa, nikoliv po podání železa ve vazbě na feritinu nebo chelátu. Tento nálezn vedl k vyslovení teorie, že

zdrojem echogenních změn je železo a) vázané na jiné proteiny než feritin nebo b) ve své nevázané reaktivní formě. V souladu s touto teorií je isoechogenita SN u zdravých osob (ačkoliv bylo potvrzeno, že se jedná o oblast na železo bohatou, jeho většina je uložena ve formě feritinu, a je tedy nejspíše neškodné). Ke zvýšení echogenity došlo také po aplikaci zinku. Navazující spektroskopie ukázala v místě aplikace zinku významný nárůst množství železa ve srovnání s kontralaterální (referenční) hemisférou. Nebylo tedy možné posoudit, zda echogenitu vyvolal primárně zinek nebo jím indukované ovlivnění metabolismu železa.

Ve druhé animální studii byli potkali usmrceni krátce po podání testovaných látek. Tkáňové řezy byly bez arteficiální fixace sonograficky vyšetřeny do 8 hodin od aplikace za podmínek simulujících standartní anatomické poměry (mozková tkáň byla vyšetřována přes přiloženou kůži a tuk zvířat). Aplikovanými látkami byla voda, železem nasycený feritin a apoferitin. Vzhledem k nastaveným časovým podmínkám se hodnotil efekt substancí „in situ“, bez možnosti ovlivnění biochemických interakcí s okolním prostředím. TCS vyšetření neprokázalo rozdílnou echogenitu mezi jednotlivými aplikovanými látkami, ačkoliv množství podaného železa bylo vyšší, než je standartně detekováno v SN v lidském mozku.(Sadowski, Szlachta et al. 2012) Rozdíly ve výsledcích obou studií byly nejspíše ovlivněny dosud neznámými procesy, ke kterým došlo v mozku živých zvířat v období mezi aplikací a zhodnocením nálezu. Injekce železa mohla způsobit zánětlivou odpověď, aktivaci gliálních buněk se změnou jejich složení nebo změnu cytoarchitektury a všechny tyto faktory mohly ovlivnit tkáňovou echogenitu.

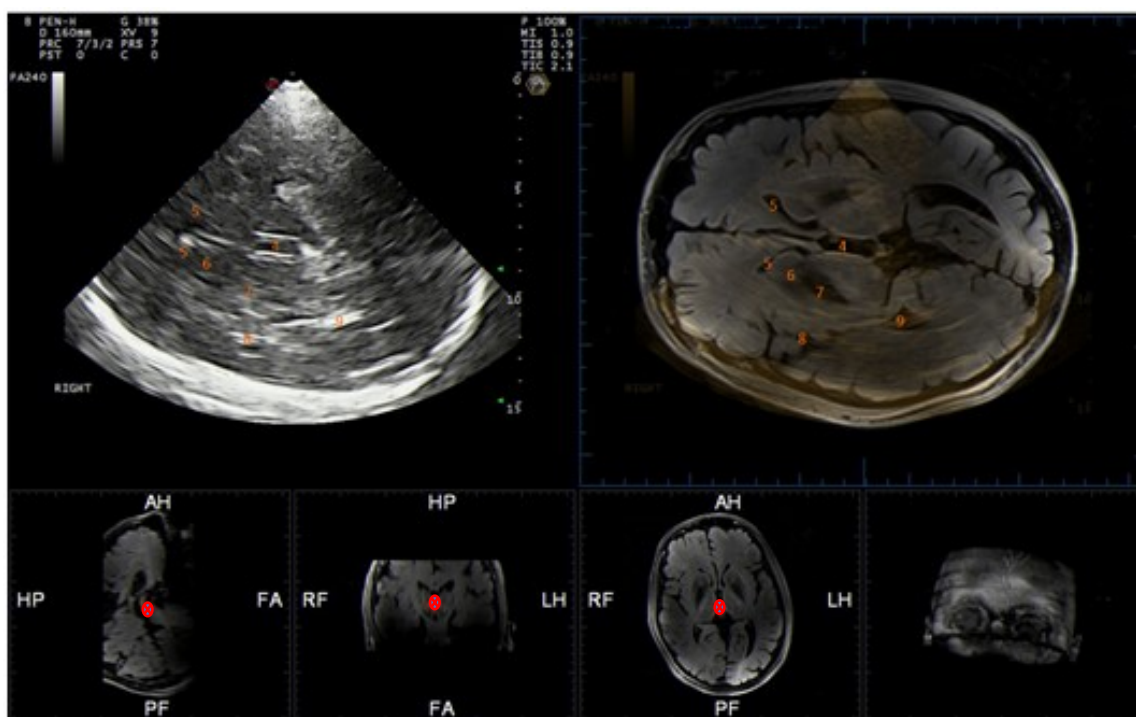
Dalším zvažovaným podkladem hyperechogenity SN je **kondenzace tkáně** po ztrátě pigmentovaných neuronů.(Berg, Siefker et al. 2001) Proti této teorii však svědčí skutečnost, že v dosud provedených longitudinálních studiích u PN se echogenita SN zdá být v čase stacionárním nálezem, zatímco degenerace dopaminergních neuronů progreduje.

Spojujícím procesem ukládání kovů a zániku buněk může být **aktivace mikroglie**. Její zásadní vliv v patogenezi PN byl prokázán v experimentálních studiích, jak na buněčných kulturách, tak na zvířecím modelu.(McGeer and McGeer 2008) Kumulace zejména volného železa v mozkové tkáni vede ke zmnožení mikroglie. Neuropatologické studie zdravých mozků prokázaly silnou korelaci aktivované glie s obsahem železa a v menší míře také s obsahem neuromelaninu.(Berg, Godau et al. 2010) Zatímco zvýšené koncentrace železa a mikroglie jsou spojeny s hyperechogenním nálezem v oblasti SN, zvýšené hodnoty neuromelaninu jsou spojeny se snížením echogenity. Vysvětlením je nejspíše schopnost neuromelaninu vázat část přítomného železa na feritin,(Tribl, Asan et al. 2009) a tím zabraňovat škodlivým sekundárním změnám (např. oxidativnímu stresu).(Berg, Grote et al. 1999) Množství neuromelaninu v SN se v průběhu života zvyšuje.(Zecca, Gallorini et al. 2001, Fedorow, Halliday et al. 2006)

K aktivaci mikroglie dochází i ve zdravém mozku, ačkoliv důvod není jasný. Mezi zvažovanými mechanismy je věkem podmíněná zvýšená propustnost hematoencefalické bariéry pro látky s vyšší molekulovou hmotností, například proteiny, včetně albuminu. Reaktivita železa vázaného na jiné proteiny než feritin se významně zvyšuje.(Oestreicher, Sengstock et al. 1994). Další zvažovanou příčinou gliální aktivity je působení chronického oxidativního stresu nebo vliv hypoxie a apoptózy buněk.(McGeer and McGeer 2008)

Echogenita na TCS je nejspíše výsledkem komplexního působení všech výše zmíněných mechanismů. U PN je přítomna narušená rovnováha ukládání a vazby železa i gliální reakce,(Berg, Gerlach et al. 2001) do které svým dílem přispívají procesy spojené s ukládáním α S.(Braak, Del Tredici et al. 2003)

V současnosti je možné provádět vyšetření TCS na běžně dostupných sonografických přístrojích, ačkoliv jejich schopnost diferenciací jednotlivých mozkových struktur se může lišit. Výhodou v rámci screeningových vyšetření by mohlo být užívání přenosných sonografických přístrojů.



Obr. 18 – Ukázka fúze transkraniální sonografie s korespondujícím řezem na magnetické rezonanci; ● červené značky slouží k finálnímu srovnání rovin

Čísla označují následující anatomické struktury: 4 - třetí mozková komora; 5 - čelní roh laterální komory; 6 - nucleus caudatus; 7 - nucleus lentiformis; 8 - inzula; 9 - okcipitální roh postranní komory

Některé přístroje nabízí v současné době možnost **fúze sonografického obrazu v reálném čase se snímky MR mozku**, což výrazně zvyšuje možnost lokalizace a zhodnocení echogenity u mnoha dalších mozkových struktur (podrobněji viz Kapitulu 4.1 a Obr.18).

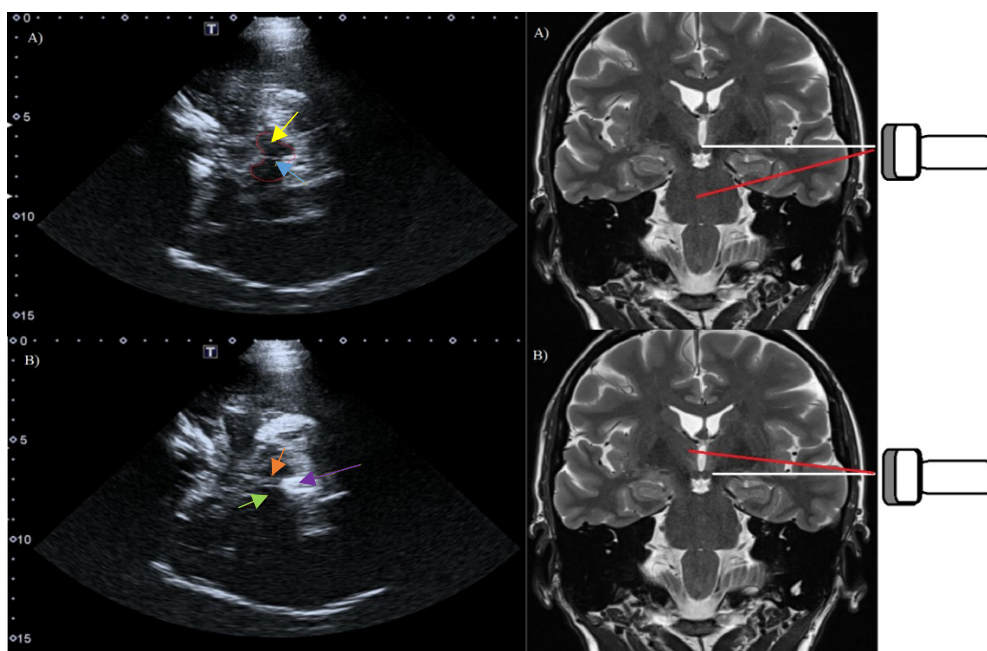
TCS vyšetření se provádí ve **standardního nastavení**, s použitím sondy s nosnými frekvencemi 2,0 – 3,5 MHz, které umožňují dostatečné rozlišení obrazu v hloubce 5-9cm, kde leží ohnisková oblast jejího snímače.(Walter, Kanowski et al. 2008) Dynamické rozmezí se pohybuje mezi 45-55 dB a hloubka obrazu je 14-16 cm. Vzhledem k vlastnostem ultrazvukového vlnění je rozlišení v axiálním řezu výrazně vyšší než při laterálním zobrazení, které může být zdrojem artefaktů (např.: zdánlivým zvětšením malých vysoce echogenních struktur). Výsledný obraz je také ovlivňován post-processingem. Při použití TCS je tedy vždy zásadně nutné stanovit pro přístroj specifický rozsah normálních hodnot echogenity.(Walter and Skoloudik 2014)

Při samotném vyšetření leží pacient na zádech a vyšetřující sedí za jeho hlavou. Ultrazvuková sonda je přikládána na spánkovou kost, před tragus, v úhlu paralelním s orbitomeatální linií (viz Obr.19 a 20). Tento sklon zajišťuje získání snímků v požadované axiální rovině. Konkrétní umístění sondy se přizpůsobuje prostupnosti kostního okna. K vyhledání nejvhodnějšího místa jemně pohybuje sondou, abychom dosáhli co nejlepšího obrazu. Při optimální kostní prostupnosti můžeme diferencovat až kontralaterální subarachnoidální prostory.



Obr. 19 – Vyšetření transkraniální sonografií: A) způsob a místo přiložení sondy; B) ultrazvukový přístroj Toshiba

Po nalezení optimálně prostupného kostního okna je nutná fixace sondy vyšetřujícím, obvykle malíkem o hlavu pacienta. Jednotlivé mozkové struktury jsou pak hodnoceny z této pozice pouhou změnou sklonu sondy do standardně definovaných řezů: čtyř transverzálních (pontinní, mozečkový, mezencefalický, talamický) a tří koronárních (přední, střední a zadní).(Huber 2010) Nejčastěji používané řezy jsou zobrazeny na Obr.20.

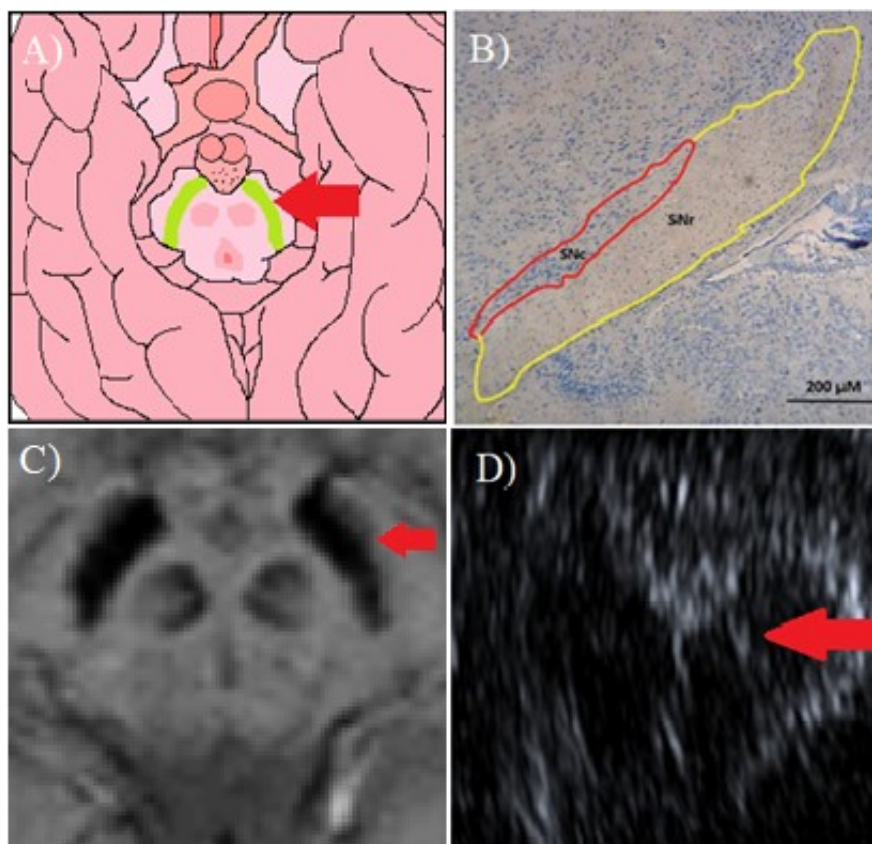


Obr. 20 – Nejčastěji užívané roviny při transkraniální sonografickém vyšetření: vpravo červeně vyznačeny roviny sklonu proti přímému řezu (bílá linie): A) mezencefalický řez (žlutě – substantia nigra, modře – nucleus raphe); B) thalamický řez (oranžově – 3. komora, fialově – epifyza, zeleně – thalamus)

Nejčastěji zobrazovanou oblastí mozku při TCS vyšetření je **mezencefalon**, který se zobrazuje jako hypoechogenní struktura motýlovitého tvaru, ostře ohraničená hyperechogenními bazálními cisternami. Přibližně v jedné třetině předozadního rozměru je možné diferencovat hyperechogenní SN(Walter, Wittstock et al. 2002, Schweitzer, Hilker et al. 2006, Walter 2011, Walter 2013, Skoloudik, Jelinkova et al. 2014, Li, He et al. 2016) nebo v blízkosti lokalizované **nucleus ruber** (jádro je uloženo v mezencefalu kaudálně, mezi nuclei raphe a SN). Signál těchto dvou struktur se může sumovat a je tedy nutné jejich odlišení jemnými pohyby sondou k určení SN, která má specifický podélný tvar a je zobrazitelná obvykle na několika axiálních řezech (viz Obr.21). Echogenitu SN je vždy nutné měřit z ipsilaterálního přístupu přes temporální okno, aby nedošlo ke zkreslení zobrazovaných struktur artefakty z bazálních cisteren.

Zdrojem rušivého hyperechogenního signálu v této oblasti mohou být také stěny drobných cév, které jsou pod rozlišovací schopností dopplerovské sonografie. V axiálním řezu se jeví jako kontinuální přímé linie (viz Kapitulu 3.1.). K finální analýze echogenity SN se volí řez s největší

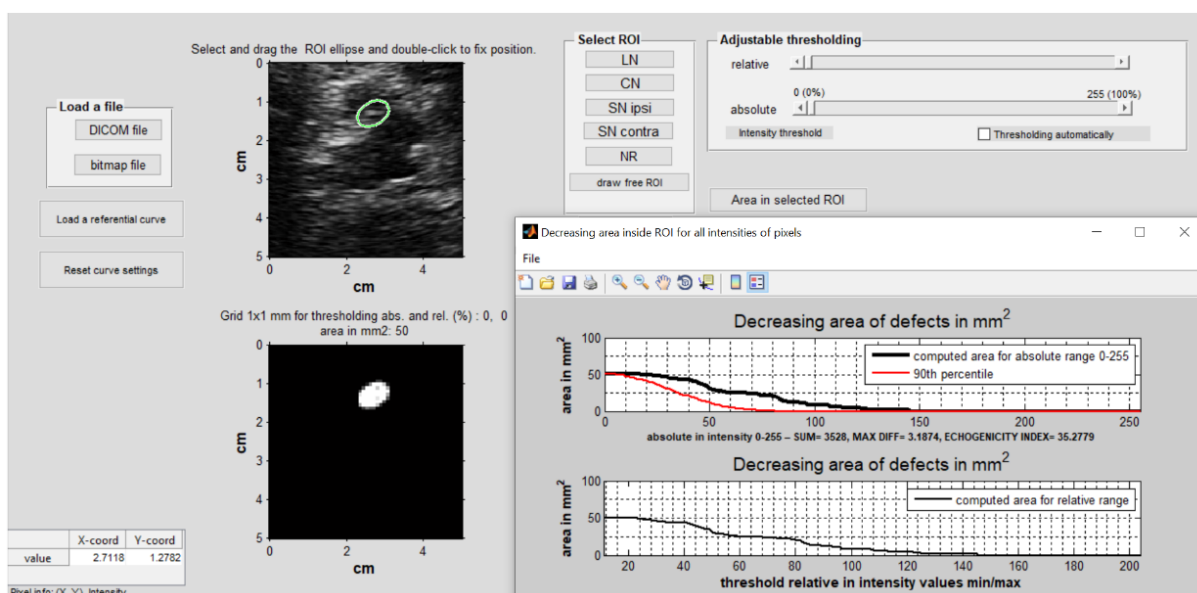
zachyceným rozměrem jádra. Jeho tvar se pochopitelně může lišit v závislosti na úhlu přiložení sondy a je tedy nutné dodržovat sklon odpovídající orbitomeatální linii.(Walter and Skoloudik 2014)



Obr. 21 – Zobrazení a lokalizace substantia nigra (SN): A) anatomická lokalizace SN; B) fotografie koronálního řezu podoblastí SN myšního mozku (pars compacta ohraničená červeně, pars reticulata ohraničená žlutě)(Hami, Hosseini et al. 2015); C) SN na magnetické rezonanci (difuze, axiální řez); D) SN na transkraniální sonografii

Druhým v diagnostice neurodegenerativních onemocnění nejčastěji používaným řezem je tzv. **thalamický řez**. Získáme ho náklonem sondy ze standardního axiálního mezencefalického řezu o přibližně 20 stupňů směrem vzhůru (viz Obr.20). V tomto řezu je možné diferencovat výrazně echogenní epifýzu (na podkladě fyziologicky přítomných kalcifikací), hypoechogenní thalamus, třetí mozkovou komoru a frontální rohy postranních komor. Za fyziologických podmínek nejsou na tomto řezu nucleus lentiformis nucleus caudatus odlišitelné od okolní bílé hmoty mozkové. Za patologických podmínek (např. WN(Walter 2010), některé atypické parkinsonské syndromy(Behnke, Berg et al. 2005, Walter, Dressler et al. 2007, Berg, Godau et al. 2008), HN nebo dystonie(Naumann, Becker et al. 1996, Walter, Blitzer et al. 2014)) se jejich echogenita zvyšuje a nález je pak semikvantitativně hodnocen jako abnormální. Na rozdíl od hodnocení SN, kde je doporučeno měření jádra ipsilaterálně, u nucleus caudatus a lentiformis se hodnotí struktury ke kostnímu oknu kontralaterálně.

Jednotlivé mozkové struktury mohou být hodnoceny buď semikvantitativně nebo kvantitativně. **Semikvantitativní hodnocení** spočívá ve stanovení normálního či anormálního nálezu, a je používáno k hodnocení struktur mozkového kmene (nuclei raphe), bazálních ganglií (nucleus lentiformis a caudatus, thalamus), mozečku nebo hlubokých mozkových struktur (např. hipokampu). **Kvantitativní hodnocení** se používá k měření šířky mozkových komor a SN arey. (Walter, Behnke et al. 2007, van de Loo, Walter et al. 2010) Nově jsou využívány i **automatizované softwarové programy**, např.: B-mode Assist System (viz Obr.22). Navržený algoritmus umožňuje zpracování oblasti zájmu (*region of interest, ROI*) na obrazech stupnice šedi s intenzitami 0-255, s následným binárním prahováním a výpočtem hodnot uvnitř požadované oblasti. Pro jednotlivé struktury jsou předdefinovány eliptické oblasti. Výsledkem analýzy jsou indexy echogenity. (Skoloudik, Jelinkova et al. 2014)



Obr. 22 – Analýza snímků transkraniální sonografie automatickým softwarem: vlevo zelená předdefinovaná eliptická oblast (ROI) pro substantia nigra, vpravo vypočítaná křivka a index echogenity

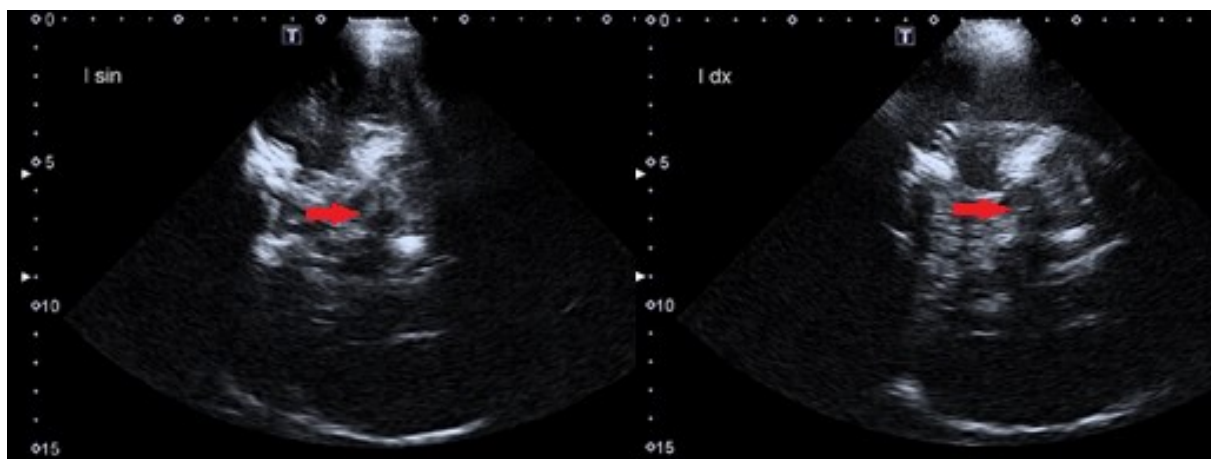
Použití automatizovaných systémů se snaží o odstranění hlavní limitace TCS, kterou je subjektivita sonografisty hodnotícího SN echogenitu. Velmi častým problémem zůstává neprostupnost temporálního okna, která kolísá mezi 5-40 % v závislosti na věku, pohlaví, rase a anatomickým strukturám lebky. (Kern, Perren et al. 2005, Walter, Kanowski et al. 2008, Go, Frenzel et al. 2012)

1.5.2.1 Typické nálezy u neurodegenerativních onemocnění

Parkinsonova nemoc

TCS je v diagnostice PN etablovanou zobrazovací metodou užívanou již několik desetiletí. Standardně hodnocenou mozkovou strukturou v transverzálním řezu je SN, jejíž abnormálně zvýšená

echogenita je v mnoha studiích popisována u více než 90 % pacientů s PN.(Walter, Dressler et al. 2007) **Abnormální nález hyperechogenní SN** bývá u PN typicky jednostranný (viz Obr.23).(Berg, Siefker et al. 2001, Walter, Wittstock et al. 2002, Walter, Niehaus et al. 2003, Behnke, Berg et al. 2005, Schmidauer, Sojer et al. 2005) Vyšší echogenita SN nemusí vždy stranově odpovídat dominujícího hybného postižení (postižené levé SN vede k pravostranné poruše hybnosti).



Obr. 23 – Typický sonografický nález u Parkinsonovy nemoci, jednostranná hyperechogenita substantia nigra (abnormální nález vlevo)

Univerzální hraniční hodnotu hyperechogenity není možné stanovit z důvodu rozdílných zobrazovacích vlastností ultrazvukových přístrojů. Mezi jednotlivými studii hodnotícím TCS nález u PN se horní hranice normy obvykle pohybuje mezi 0,19-0,25 cm² při manuálním ohraničení hyperechogenní oblasti.(Berg 2006, Berg, Behnke et al. 2006, Berg, Godau et al. 2008, Walter 2009, Walter and Skoloudik 2014, Yilmaz and Berg 2018) Vyšetření TCS dosahuje v diagnostice PN vysoké specifity 83-87 % a senzitivity 93-100 %.(Gaenslen, Unmuth et al. 2008, Bor-Seng-Shu, Pedrosa et al. 2014) V publikovaných studiích nebyla prokázána asociace mezi echogenitou SN a pohlavím nebo délkou trvání symptomů PN.(Walter, Dressler et al. 2007) Vyšší hodnoty echogenity a bilaterálně abnormální nález bývá u PN přítomný u pacientů s nízkým věkem počátku příznaků PN.(Berg, Siefker et al. 2001, Walter, Dressler et al. 2007) Vztah echogenity SN a věku je však stále diskutovanou otázkou.(Berg, Siefker et al. 2001, Hagenah, König et al. 2010)

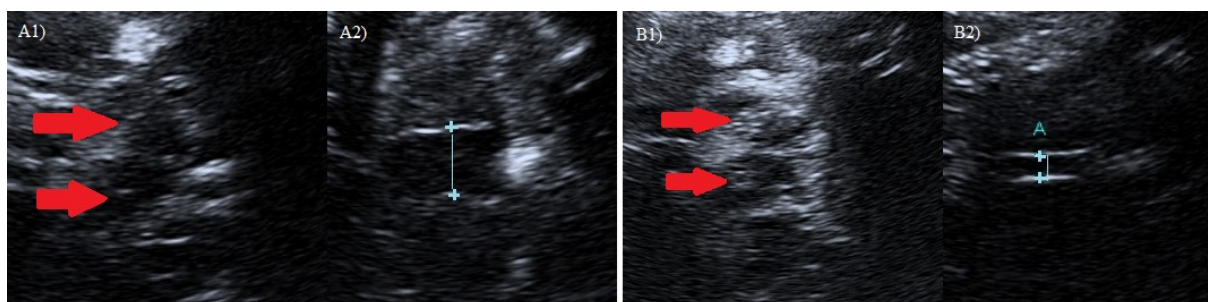
Zvýšená echogenita SN je popisována **také u 10 % zdravé populace**. Klinický význam tohoto nálezu není zatím zcela jasný, ačkoliv v některých studiích porovnávajících nález na TCS s metodami nukleární medicíny byl u 60 % těchto subjektů zjištěn subklinický deficit nigrostriatálních drah.(Berg, Becker et al. 1999) Abnormální nález na TCS zvyšuje riziko rozvoje PN u jeho nositele dvacetinásobně proti zdravé populaci. Nicméně u více než 80 % těchto osob v riziku k rozvoji manifestního onemocnění nedojde.(Berg, Behnke et al. 2013) K přesnějšímu určení osob v riziku

rozvoje PN nebo jiné neurodegenerace se kromě TCS užívá také čichový test nebo polysomnografické vyšetření k vyloučení RBD.

Atypické parkinsonské syndromy

U atypických parkinsonských syndromů (APS) není TCS nález typický ani konzistentní.(Walter, Niehaus et al. 2003, Behnke, Berg et al. 2005, Bouwmans, Vlaar et al. 2010, Bor-Seng-Shu, Paschoal et al. 2019) Liší se mezi jednotlivými diagnózami (viz Obr.24), ale i mezi pacienty s totožným onemocněním (např. u MSA je hyperechogenita SN přítomna u 10-50 % pacientů).(Behnke, Berg et al. 2005, Walter, Dressler et al. 2007, Bartova, Skoloudik et al. 2008) I přesto může být TCS nález, v kombinaci s dalšími zobrazeními a klinickým nálezem, u APS přínosem. Ačkoliv mechanismus vlivu poruch metabolismu kovů je u APS nejasný, všechny mají společnou ztrátu neuronů a reaktivní gliózu.(Sadowski, Szlachta et al. 2012)

U MSA může být echogenita SN normální či zvýšená, nucleus lentiformis bývá hyperechogenní a komorový systém nebývá rozšířený.(Eapen, Baker et al. 2017, Zhou, Huang et al. 2018) Naproti tomu u PSP bývá nález na SN v normě, ale třetí komora bývá výrazně dilatována (obvykle na více než 10 mm), což odpovídá pro PSP typické globální mozkové atrofii.(Walter, Dressler et al. 2007) Přibližně 10-15 % pacientů s MSA nebo PSP mají nález typický pro PN (asymetrický hyperechogenní nález na SN). U APS je s vyšší frekvencí popisován normální nález na SN v kombinaci s hyperechogenitou nucleus lentiformis,(Walter, Niehaus et al. 2003, Walter, Dressler et al. 2004, Behnke, Berg et al. 2005). Tento nález vylučuje PN s prediktivní hodnotou až 100 %. Jednou ze zvažovaných příčin změny echogenity nucleus lentiformis je kumulace kovů.(Becker, Berg et al. 1999, Walter, Niehaus et al. 2003, Walter, Krolkowski et al. 2005) Vzhledem k vysoké incidenci hyperechogenity SN u pacientů s PN s počátkem před 60. rokem věku, je v této podskupině normální nález na SN sám o sobě suspektní z atypického parkinsonského syndromu (MSA-P či PSP) se senzitivitou 75 % a prediktivní hodnotou 100 %.(Walter, Dressler et al. 2007)

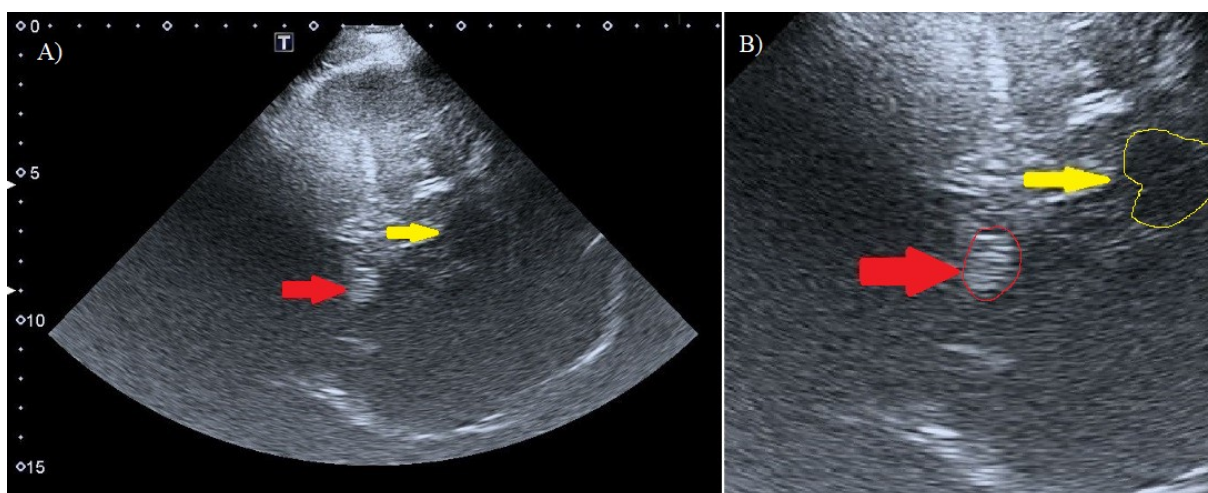


Obr. 24 – Vybrané snímky transkraniální sonografie pacientů sledovaných pro atypický parkinsonský syndrom: A) progresivní supranukleární obrna (A1 – normální substantia nigra, A2 – dilatace 3. mozkové komory); B) demence s Lewyho tělísky, stejný nález mohou mít i pacienti s multisystémovou atrofií (B1 – hyperechogenita substantia nigra, B2 – 3. mozková komora normální šířky)

Symetrická bilaterální hyperechogenita SN se ve vysokém procentu objevuje u **DLB** (až u 80-100 %).(Walter, Dressler et al. 2006, Favaretto, Walter et al. 2016) Abnormální nález na TCS v kombinaci s klinickými příznaky a věkem jejich nástupu, bývá pro diferenciální diagnostiku mezi DLB a PN s demencí (PND) dostačující. Dosahuje vysoké senzitivity (96 %) i specificity (80 %).(Walter, Dressler et al. 2006) Imunohistologické vyšetření animálních modelů DLB prokázalo vyšší koncentrace železa v oblasti SN(Fernandez, Ferrer et al. 2017). Na konvenčním MR mozků u pacientů s DLB se korelát TCS změn neprokázal a kvantitativní studie nebyla zatím provedena.

Wilsonova nemoc

Pro pacienty s WN je typický nález hyperechogenního **nucleus lentiformis** (viz Obr. 25), který může předcházet abnormálnímu nálezu T2 hypointenzit na MR mozku.(Walter, Krolkowski et al. 2005, Walter, Behnke et al. 2007) Abnormální TCS nález je přítomen nejen u dosud neurologicky asymptomatických jedinců, ale i u pacientů s hepatální formou onemocnění.(Walter, Krolkowski et al. 2005, Svetel, Mijajlovic et al. 2012) V některých studiích byla zachycena i hyperechogenita SN (31,5-50 % pacientů s WN),(Walter, Krolkowski et al. 2005, Svetel, Mijajlovic et al. 2012) snížená echogenita nuclei raphe (typický sonografický nález u depresí)(Mijajlovic 2010) nebo zvýšený signál periaquoduktální šedé hmoty.(Ricciardi, Sirimarco et al. 2010) Šíře třetí mozkové komory měřené TCS bývá srovnatelná se zdravými kontrolami, ale byl popsán signifikantní rozdíl v její velikosti podle převažující formy postižení WN (neurologická > hepatální forma).(Svetel, Mijajlovic et al. 2012)



Obr. 25 – Typický sonografický nález u Wilsonovy nemoci: A) thalamický řez (červená šipka – hyperechogenní nucleus lentiformis; žlutá šipka – naznačený obrys thalamu); B) detail snímku vpravo s demarkací struktur

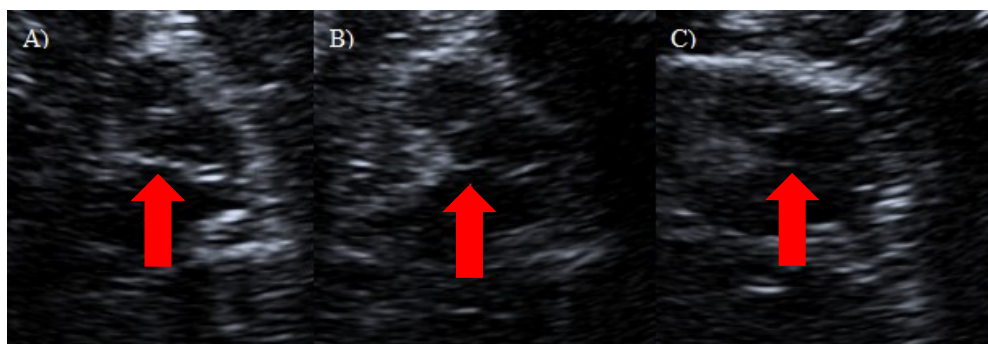
Vzhledem k prokázané akumulaci nejen mědi, ale i železa u pacientů s WN byla ke zjištění podkladu změn na TCS provedena studie s histologickým vyšetřením mozkové tkáně post mortem. Ty prokázaly homogenně rozloženou zvýšenou kumulaci mědi ve všech zkoumaných strukturách. Depozita železa byla přítomna zejména v putamen a globus pallidus,(Dusek, Bahn et al. 2017) v nižší koncentraci také v nucleus dentatus.(Litwin, Gromadzka et al. 2013) Tyto nálezy byly potvrzeny i u animálních studií.(Kim, Ko et al. 2005) V neuropatologickém vyšetření pacientů s WN korelovala echogenita nucleus lentiformis pouze s putaminálním obsahem mědi a nikoliv železa.(Walter, Skowronska et al. 2014)

Další užití transkraniální sonografie

Dosud bylo provedeno pouze několik studií se zaměřením na užití TCS u **HN**. Abnormální sonografický nález byl přítomný u 40 % pacientů. Nejčastějším nálezem byla, většinou bilaterální, hyperechogenita SN (27 %), která korelovala s počtem CAG repetit. Dalšími nálezy zejména u pacientů s menším počtem tripletů byla hyperechogenita nucleus caudatus (13 %) a nucleus lentiformis (7 %). Echogenní změny nucleus caudatus měly hypersignální korelát na T2 vážených obrazech.(Krogias, Eyding et al. 2010, Krogias, Strassburger et al. 2011)

Z dalších extrapyramidových poruch hybnosti se TCS užívá u **dystonií**, kde bývá typicky přítomný hyperechogenní signál v oblasti nucleus lentiformis. Nález byl popsán až u 75 % pacientů s cervikální dystonií a ve vysokém procentu i u ostatních fokálních dystonií s výjimkou obličejových.(Gaenslen 2010) V neuropatologických studiích byla u pacientů s dystonií zjištěna kumulace mědi v sonograficky abnormálních tkáních. Obsah železa v nich byl v normě.(Becker, Berg et al. 1999, Becker, Berg et al. 2001, Walter, Blitzer et al. 2014)

Semikvantitativní hodnocení echogenity nucleu raphe je uznávanou pomocnou zobrazovací metodou u pacientů trpících **depresí**. Pokud není oblast nucleu raphe detekovatelná (na stupnici 0, anechogenní) nebo je echogenita této oblasti přerušovaná (na stupnici 1) je celkově nález hodnocen jako hypoechogenní. Pokud je linie jasně echogenní, ostrá, nepřerušovaná (na stupnici 2), pak je nález hodnocen jako normální (viz Obr.26). Snížená echogenita nucleu raphe je zobrazitelná asi u 10 % zdravých subjektů a u 50-70 % pacientů s depresí. Předpokládá se, že nález reflektuje postižení serotoninergního systému a koreluje s klinickými projevy deprese i u dalších onemocnění (např. PN, HN, schizofrenie).(Walter, Dressler et al. 2007)·(Becker, Becker et al. 1997, Walter, Krolikowski et al. 2005)



Obr.26 – Nuclei raphe na transkraniální sonografii: A) normální nález; B) hraniční nález; C) výrazně abnormální

TCS se dá použít také k hodnocení **atrofie mozku** nebo dilatace likvorového kompartmentu u normotenzního hydrocefalu.(Berg, Godau et al. 2008) Místem měření je buď třetí mozková komora na axiálním talamickém řezu nebo frontální roh postranní komory. Bylo prokázáno, že zvětšující se šíře komorového systému na TCS koreluje se stupněm kognitivního postižení u zdravé stárnoucí populace.(Wollenweber, Schomburg et al. 2011). TCS se používá také k hodnocení míry lokální atrofie v meziotemporální oblasti u demencí.(Yilmaz, Pilotto et al. 2017)

U pacientů s idiopatickou formou **syndromu neklidných nohou** bývá popisována snížená echogenita SN, jejíž patofyziologický podklad ani klinický nález nejsou zcela jasné.(Schmidauer, Sojer et al. 2005) Specifickou indikací TCS je kontrola polohy elektrod u pacientů s hlubokou mozkovou stimulací (*deep brain stimulation, DBS*). (Saleh, Dooms et al. 2016)

2 Cíle a hypotézy práce

- 1) Porovnat změny echogenity substantia nigra a nucleus lentiformis u pacientů s Parkinsonovou nemocí s časným počátkem a s Wilsonovou nemocí.

***Hypotéza:** Transkraniální sonografické vyšetření nucleus lentiformis by mohlo sloužit jako podpůrná diagnostická metoda Wilsonovy nemoci i v diferenciální diagnostice parkinsonského syndromu s časným nástupem.*

- 2) Zjistit, zda je možné při zpřesnění umístění jednotlivých mozkových struktur fúzí MR a transkraniální sonografie využít v diagnostice neurodegenerativních onemocnění i další, dosud nehodnocené, struktury.

***Hypotéza:** Oblast inzuly se jeví jako další struktura mozku, jejíž změny echogenity je možné pozorovat u Wilsonovy nemoci.*

- 3) Porovnat echogenitu SN mezi kontrolami, idiopatickou RBD a Parkinsonovou nemocí s a bez diagnostikované RBD. Dále zhodnotit asociaci mezi degenerací SN hodnocenou na DAT-SPECT a TCS.

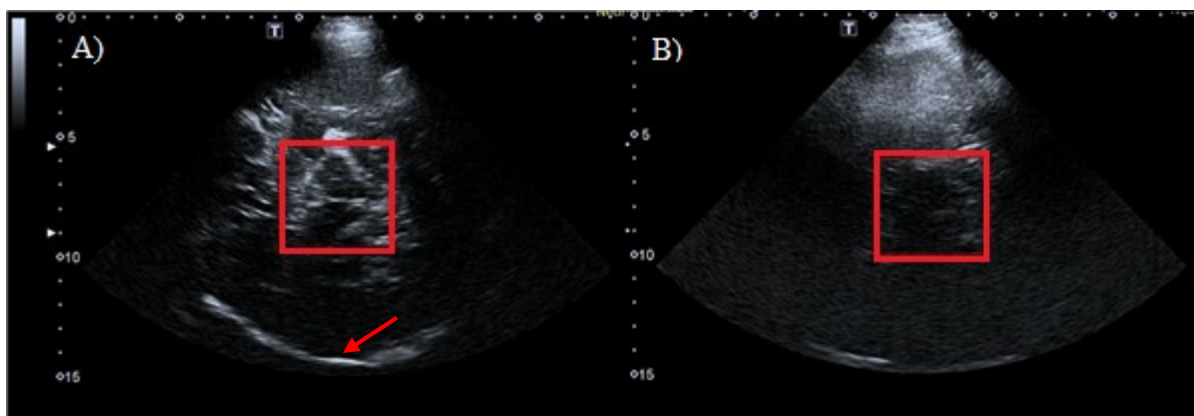
***Hypotéza:** Echogenita SN u pacientů s RBD, která je známým rizikovým faktorem rozvoje synukleinopatií, je opakovaně hodnocena jako abnormální u většiny vyšetřovaných pacientů. Hodnoty SN arey by se mohly u pacientů s Parkinsonovou nemocí lišit na základě současné přítomnosti či absenci poruchy chování ve spánku.*

3 Použitá metodika

3.1 Transkraniální sonografie

Ve všech třech provedených studiích byla použita TCS, která je sice zavedenou vyšetřovací metodou v diagnostice PN, ale u jiných onemocnění není v běžné praxi používána. Uplatněním několika technických prvků (TCS/MR fúze a analytický software) jsme se pokusili nejen o posouzení možnosti rozšíření klinického použití TCS, ale zejména o pochopení strukturálního nebo ložiskového podkladu echogenity samotné. S ohledem na opakovaně udávaný podíl kumulace kovů jsme ke studiím použili dvě onemocnění, u kterých byla patogeneze železa (PN) a mědi (WN) již prokázána.

Všechna sonografická vyšetření proběhla za standardního nastavení sonografických přístrojů ve dvou rovinách – mezencefalické a talamické. Do finálních analýz byly zařazovány pouze subjekty, u kterých bylo **kostní okno bilaterálně prostupné** a kvalita diferenciací mozkových struktur umožňovala jejich spolehlivé odlišení (jedním z ukazatelů byla možnost vizualizace hypersignálního kontralaterálního kortexu a subarachnoidálních prostorů; viz Obr.29).

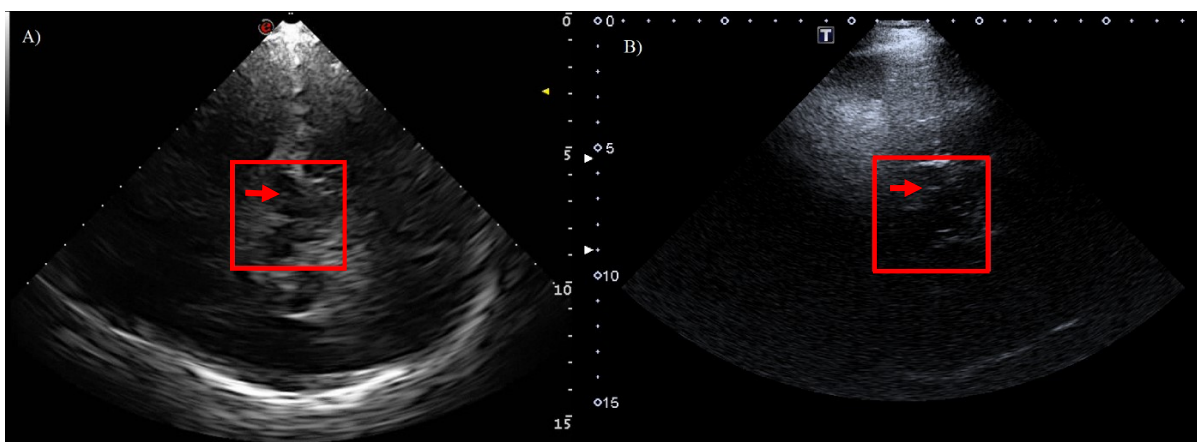


Obr.29 – Rozdílná kvalita snímků dle prostupnosti kostního okna, ve čtverci vyznačena oblast mezencefala: A) dobře prostupné kostní okno, šipka označuje subarachnoidální prostory kontralaterálně; B) snížená prostupnost kostního okna

V porovnání s předchozími prováděnými sonografickými studiemi nebyla u vyšetřovaných prováděna dodatečná manuální korekce nastavených hodnot za účelem zlepšení vizualizace zkoumaných struktur. Dostatečná kvalita snímků byla nezbytně nutná jak pro fúzi, tak pro manuální ohraničování struktur a softwarovou analýzu. S ohledem na vyšší procento vyřazených byl nutný nábor většího počtu subjektů, pokud to bylo u dané skupiny možné.

Použití dvou **odlišných sonografických přístrojů** poukázalo na některé limity TCS. Pro fúzní studie byl použit přístroj Esaote MyLab Twice vybavený funkcí Virtuální navigace (viz kapitolu 3.2.) a pro studii III byl použit přístroj Toshiba Aplio 300. I přes totožné nastavení se výsledný sonografický obraz mezi přístroji liší (viz Obr.30). Významnou limitací se ukázala být horší

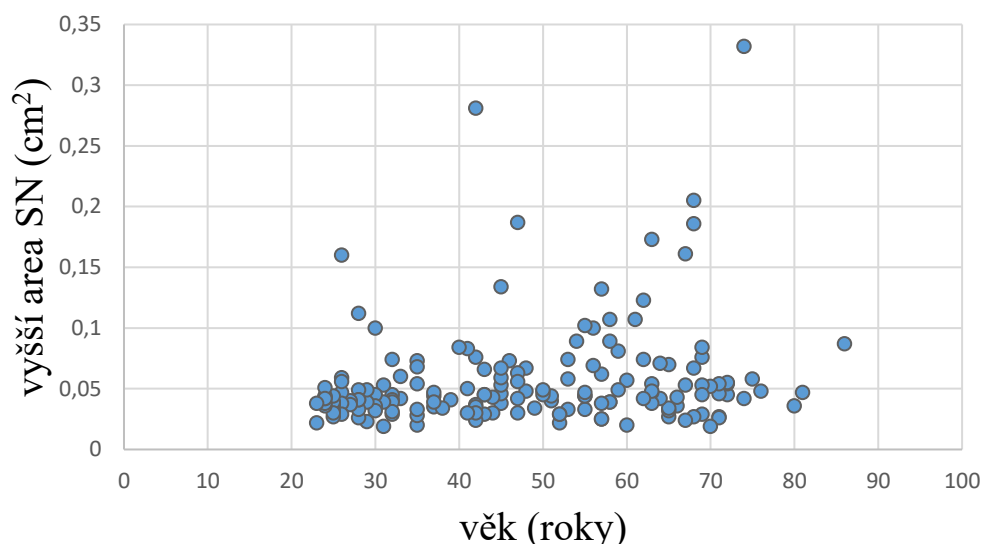
přehlednost subkortikálních struktur u přístroje Toshiba, který však detailněji zobrazuje oblast mezencefala. Tento typ sonografických přístrojů není v dosud provedených TCS studiích běžně užíván a bylo tedy nezbytně nutné stanovení vlastních hodnotících parametrů.



Obr.30 – Zobrazení mezencefala a substantia nigra u stejného subjektu za totožného nastavení na dvou odlišných sonografických přístrojích: A) Esaote; B) Toshiba

Mezní hodnota (cut off) SN arey pro Aplio ve studii III byla stanovena jako optimální pro odlišení pacientů s PN od zdravých kontrol na základě ROC analýzy. Pokud by se cut off stanovil jako 90. percentil SN arey v kohortě zdravých subjektů, došlo by ke snížení jeho hodnoty. Cut off hodnoty jsou tedy závislé nejen na použití přístroje a jeho nastavení, ale i na výběru principu jeho výpočtu. Často uplatňované přebírání mezních hodnot z jiných studií, namísto stanovení vlastních, může v některých případech ovlivňovat hodnocení nálezu TCS.

K finální analýze echogenicity SN byly místo průměrné hodnoty použity mediány. **Vztah SN arey ke stárnutí** byl předmětem několika studií a většina z nich hodnotila echogenitu SN jako na věku nezávislou. Výjimkou byla, kde byly do analýzy primárně zařazeny děti. (Iova, Garmashov et al. 2004) Dostatečnou hodnotou ke stanovení vlastní TCS cut off hodnoty je padesát subjektů. (Walter and Skoloudik 2014) což bylo v naší studii naplněno. Vyšetření zdravé kohorty, zahrnující 169 dobrovolníků s bilaterálně prostupným temporálním oknem ve věku 23-86 let (průměrný věk $47,7 \pm 16,35$) bez anamnézy neurologického nebo psychiatrického onemocnění, ukázalo nepravidelné rozložení SN arey (viz.Obr.31). Kromě zdravotníků, jejich rodinných příslušníků byly vyšetřeny také studenti nebo zdraví senioři. Vyšetření starších žen bylo komplikováno přítomností osteoporózy. Všechny zařazené kontroly byly základně neurologicky vyšetřeny k vyloučení přítomnosti příznaků parkinsonského syndromu.



Obr.31: Rozložení arey substantia nigra v závislosti na věku

Ve fúzních studiích (I a II) s použitím přístroje Esaote byl k posouzení echogenity použit automatický softwarový systém a z něj vycházející indexy echogenity, ve studii s použitím Toshiba bylo použito dodatečné manuální ohraničení struktur v **ImageJ** dvěma nezávislými hodnotiteli. B-assist mode k analýze vyžaduje stanovení referenčních křivek pro jednotlivé sonografické přístroje, které v době studie III nebyly pro Toshiba dostupné. Alternativně zkoušený přepočtení indexů echogenity SN k echogenicitě standardně hypoechogenního thalamu nedosáhlo dostatečné rozlišovací schopnosti mezi PN a zdravými subjekty.

3.2 Fúze transkraniální sonografie a magnetické rezonance

Ultrazuková fúze je relativně novou technikou umožňující porovnávání v danou chvíli vyšetřovaných sonografických snímků s předem získanými snímky z CT nebo MR. Během provádění standardního transkraniálního vyšetření, systém poskytuje přesný obraz na TCS snímaných struktur na MR, a je schopný se okamžitě přizpůsobovat pohybu sondou. (Walter, Muller et al. 2016)

V případě našich **TCS/MR fúzních studií** byli snímky MR mozku pacienta nahrány ve formátu DICOM (*Digital Imaging and Communications in Medicine*) do ultrazukového přístroj, který je převedl do 3D formátu včetně vytvoření 3D modelu hlavy. Pacient byl vyšetřován v poloze na zádech se zafixovanou hlavou k zamezení případných nežádoucích pohybů (viz Obr.32). Na čelo pacienta byl umístěn malý senzor snímač elektromagnetického schopný korekce případných drobných pohybů během fúze. Pro sjednocení jednotlivých zobrazovacích metod se následně použil značkovač s připojeným elektromagnetickým snímačem, komunikujícím s vysílačem elektromagnetického pole zaměřeného na studovanou oblast mozku, kterým se označily alespoň 4 orientační body na obličeji

pacienta (obvykle čelo, nos a oční koutky). Poté se snímač od značkovače odpojil a připojil se na ultrazvukovou sondu.

Doba fúzování závisela na přesnosti umístění externích orientačních bodů a následném detailnějším doladění fúze například podle intrakraniálně snadno detekovatelných struktur (např. epifyza či třetí mozková komora). Po úspěšné fúzi bylo možné na obrazovce ultrazvuku prohlížet jak izolované TSK snímky nebo MR snímky, tak jejich vzájemné překrytí v jednom obraze.



Obr.32 – Proces fúzování: A) 3D model hlavy odvozený ze snímků magnetické rezonance (MR), zeleně vyznačené fixační body; B) MR snímek s vyznačenými fixačními body; C) vysílač elektromagnetického pole; D) na pohyb citlivý senzor; E) značkovač s možností připojení elektromagnetického snímače; F) transkraniální ultrazvuková sonda s připojeným snímačem elektromagnetického pole; (ilustrativní snímek použití totožného fúzní systému (Stephan J. Schreiber 2014))

4 Popisy jednotlivých studií

4.1 Studie I – Porovnání fúze transkraniální sonografie a magnetické rezonance u Wilsonovy nemoci a Parkinsonovy nemoci s časným počátkem

4.1.1 Úvod

Diagnóza **neurologické formy WN** nebývá problematická, pokud se manifestuje obvyklými příznaky nebo je prokázána genetické mutace ATP7B.(Ferenci 2004) Existují však případy s atypickým průběhem onemocnění, které nemusí splňovat všechna klinická a laboratorní kritéria pro diagnózu WN.(Youn, Kim et al. 2012) Kromě toho může být i genetické potvrzení obtížné, protože gen ATP7B je velký a bylo popsáno **více než 750 mutací**, některé s pochybnou patogenitou.(Bennett and Hahn 2011)

WN se může projevit různými kombinacemi třesu, parkinsonismu, dystonie, chorey a ataxie, takže každý pacient s poruchou hybnosti (zejména extrapyramidovou) s počátkem obtíží v dětství nebo mladé věku by měl podstoupit screening na WN. Vzhledem k tomu, že jedním z nejběžnějších příznaků u WN je parkinsonismus, stává se diferenciální diagnostika mezi WN a EO-PN zcela klíčovou, zejména v komplikovaných nebo atypických případech (např. s atypickými laboratorními hodnotami). Správná diagnóza je nezbytná pro výběr adekvátní terapie.

TCS již byla validována jako vysoce citlivý a specifický nástroj v diagnostice raného stadia PN.(Walter, Dressler et al. 2007) U neurologické formy WN je echogenita SN vysoce variabilní, zatímco hyperechogenita nucleus lentiformis je konzistentní.(Walter, Krolkowski et al. 2005, Ricciardi, Sirimarco et al. 2010, Svetel, Mijajlovic et al. 2012, Martinez-Fernandez, Caballol et al. 2013, Walter, Skowronska et al. 2014) Vztah mezi abnormálním nálezem na TCS a typickým obrazem na MR mozku – hyperintenzity bazálních ganglií, mozkového kmene a thalamu v T2 vážených obrazech – není u pacientů s WN jasný. U obou zobrazovacích metod převažují signálové změny v bazálních ganglií nad oblastí mozkového kmene.(Sinha, Taly et al. 2006) Hyperechogenita nucleus lentiformis byla popsána i u pacientů s normálním nálezem mozkové MR, což naznačuje, že TCS může být citlivější při detekci základní patologie.(Walter, Krolkowski et al. 2005)

S ohledem na zmíněné odlišné sonografické charakteristiky pacientů s EO-PN a WN by TCS mohla být podpůrnou diagnostickou metodou u WN, zejména v případech manifestujících se primárně parkinsonismem. Je však nutné minimalizovat chybovost subjektivního hodnocení TCS nálezů. K tomu přispívá digitální automatické hodnocení echogenity a ultrasonografická fúze s MR nebo CT.(Skoloudik, Jelinkova et al. 2014)

Cílem studie bylo porovnat změny echogenity v SN a nucleus lentiformis u pacientů s EO-PN a s WN a posoudit TCS jako podpůrnou diagnostickou metodu u těchto onemocnění. S využitím fúze s TCS jsme se pokusili zpřesnit lokalizaci vyšetřovaných struktur a zhodnotit případná depozita kovů podmiňujících sonografické změny.

4.1.2 Metodika

Pacienti

U pacientů s WN byla inkluzním kritériem **neurologická forma** stanovená podle Lipských kritérií (Wong, Gish et al. 2011). Do skupiny EO-PN byli zařazeni pacienti diagnostikovaní v souladu s kritérii UK Parkinson's Disease Society Brain Bank, u kterých byla vyloučena WN a jejich věk na začátku klinických obtíží nepřesáhl 40 let. Vylučovacími kritérii pro obě skupiny byla přítomnost hluboké mozkové stimulace a nedostatečné temporální kostní okno pro sonografické vyšetření.

Do studie bylo zařazeno 22 pacientů s WN a 16 pacientů s EO-PN sledovaných v Centru extrapyramidových onemocnění Všeobecné fakultní nemocnice. Hlavním problémem náboru pacientů s PN s časným počátkem byla frekventní léčba hlubokou mozkovou stimulací, která je u této skupiny velmi častá. Kontrolní skupinu tvořilo 24 zdravých jedinců bez anamnézy neurologického nebo psychiatrického onemocnění.

Tabulka 4 – Demografická a klinická data

	WN	EO-PN	Kontroly
Počet pacientů (ženy)	22 (11)	16 (9)	24 (16)
Věk; průměr ± směrodatná odchylka (roky)*	43,9±8,7	42,2±5,2	37,6±10,3
Trvání nemoci (roky)**	17,1±9,9	7,7±4,7	-
Trvání terapie (roky)*	13,5±7,2	3,8±1,9	-
UPDRS-III subskóre; průměr; medián (mezikvartilový rozptyl)	-	21,3; 16,0 (12,0-32,0)	-
UWDRS neurologické subskóre; průměr; medián (mezikvartilový rozptyl)	19,6; 13,5 (7,0-30,5)	-	-
UWDRS/UPDRS-III společné parkinsonské subskóre; průměr; medián (mezikvartilový rozptyl) *	9,1; 4,5 (2,0-14,3)	14,9; 13,0 (9,0-21,0)	-
L-DOPA ekvivalent (mg)	-	623,4±453,2	-
Počet pacientů na d-PEN/zinku/kombinované terapii	7/8/4	-	-
Složené skóre závažnosti MR; průměr; medián (mezikvartilový rozptyl) **	5,9; 6,0 (2,0-8,5)	2,3; 2,00 (1,0-3,5)	-
Index echogenity SN**	28,0 ± 4,6	39,8 ± 5,9	28,8 ± 4,9
Index echogenity NL**	117,5 ± 37,0	61,6 ± 5,4	54,9 ± 11,2
Index echogenity NC**	47,5 ± 16,5	39,6 ± 9,2	34,4 ± 7,4

*Hodnoty udávány jako průměr ± směrodatná odchylka; * p < 0,05, ** p < 0,01*

Zkratky: WN – Wilsonova nemoc, EO-PN – early-onset Parkinsonova nemoc, UWDRS – Unified Wilson's Disease Rating Scale, UPDRS-III – Unified Parkinson's Disease Rating Scale, část III, d-PEN – d-penicilamin, SN – substantia nigra, NL – nucleus lentiformis, NC – nucleus caudatus

Devatenáct pacientů s WN bylo uspokojivě kompenzováno na perorální léčbě, jeden podstoupil transplantaci jater a dva byli v době účasti ve studii de novo neléčení pacienti (viz Tabulku 4). Kromě splnění klinických kritérií byla u 16 subjektů dg. WN také geneticky potvrzena mutační analýzou. Stejně tak všichni pacienti s PN byli testováni na mutaci PARK2 (heterozygotní patogenní mutace byla nalezena u jednoho z nich). Patnáct pacientů s PN užívalo stabilní antiparkinsonskou léčbu, zatímco jeden byl dosud bez terapie.

Klinické hodnocení

Závažnost neurologického postižení byla u pacientů hodnocena na základě jejich diagnózy buď pomocí neurologického subskóre **Unified Wilson's Disease Rating Scale (UWDRS)** (Leinweber, Moller et al. 2008) u WN a podle **Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS)** u skupiny PN se zaměřením na její motorické subskóre (UPDRS-III). (Tilley, LaPelle et al. 2014) Hodnocení hybnosti bylo provedeno na standardně užívané medikaci. Pro porovnání mezi jednotlivými skupinami a škálami bylo vytvořeno „společné parkinsonské subskóre“ z položek, které jsou pro obě výše uvedené škály společné (všechny položky UPDRS-III bez položek 24, 30 a 31).

Magnetická rezonance

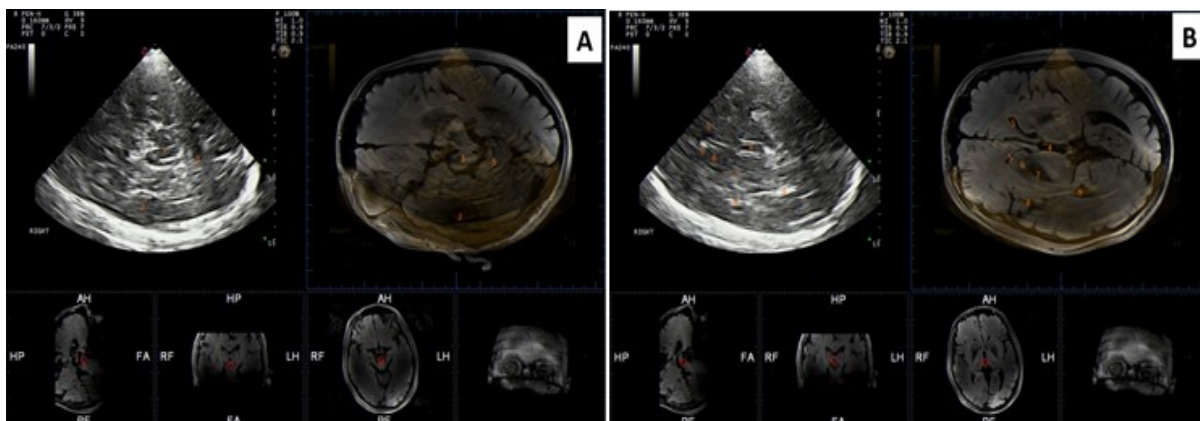
MR mozku byla u všech pacientů s PN a WN provedena na **1.5T přístroji** (Philips Achieva). Pro vyloučení strukturální patologie byly použity standardní T1 vážené sekvence (rozlišení 1.2x1.2x3mm³, TE 15ms, TR 500ms) a T2 vážené sekvence (rozlišení 0.5x0.5x2mm³, TE 233ms, TR 2250ms). Byl zhodnocen stupeň postižení mozkové tkáně a získané snímky byly použity pro následnou fúzi s ultrazvukovým vyšetřením. Nálezy na MR byly hodnoceny zkušeným neuroradiologem zaslepeným vůči základní diagnóze.

Patologie MR byla hodnocena v souladu s předchozími publikovanými studiemi stejného zaměření (Frota, Barbosa et al. 2013). Byl hodnocen stupeň atrofie – nepřítomný (0 bodů), mírný (1 bod) nebo těžký (2 body) - na třech místech: 1) v mozečku a mozkovém kmeni. 2) v bazálních gangliích a subkortikální oblasti a 3) v kůře. Dále byla hodnocena přítomnost T2 hypersignálních změn v nucleus caudatus, putamen, globus pallidus, thalamu, mezencefalu, pontu a T2 hypointenzit v nucleus lentiformis, nucleus dentatus a SN. Celkový součet atrofie a změn signálu vytvořil souhrnné skóre závažnosti MR patologie (maximálně 15 bodů).

Transkraniální sonografie

Ultrazvukový přístroj Esaote byl vybaven funkcí virtuální navigace a fúze s MR snímky (viz Kapitulu 3.2). Vyšetření bylo provedeno přes pravé i levé temporální okno v obvyklém nastavení. Pro

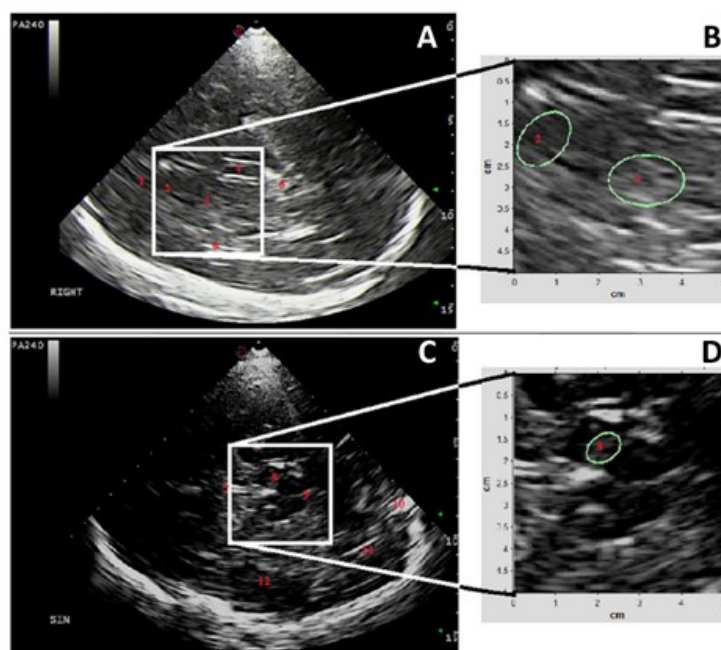
hodnocení struktur na TCS byl u SN použit mezencefalický řez a u nucleus lentiformis caudatus talamický řez (viz Obr. 34).



Obr. 33 - Typické nálezy na transkraniální sonografii u pacienta s Wilsonovou nemocí, s odpovídajícími obrazy MR zobrazené pomocí techniky fúzního zobrazování. A) axiální mezencefalická rovina s normální echogenitou SN; B) axiální talamická rovina s hyperechogenním nucleus lentiformis

Čísla označují následující anatomické struktury: 1 - mesencephalon; 2 - spánkový lalok; 3 - mozeček; 4 - třetí mozková komora; 5 - čelní roh laterální komory; 6 – nucleus caudatus; 7 - nucleus lentiformis; 8 - inzula; 9 - okcipitální roh postranní komory.

Všechny získané snímky byly uloženy ve formátu DICOM, ale pro následující zpracování digitální analýzy a měření byly převedeny do 8bitové stupnice šedi. Navržený algoritmus umožnil vyhodnocení oblasti zájmu na obrazech ve stupních šedi s intenzitami $I=0-255$. Předdefinované eliptické ROI byly ručně umístěny do oblasti kontralaterálních nucleus caudatus a nucleus lentiformis (viz Obr. 34B) a ipsilaterálních SN (viz Obr. 34D). Index echogenity byl vypočítán samostatně pro jednotlivá jádra jak z pravého, tak z levého temporálního kostního okna, a pro analýzu byla použita vyšší hodnota obou měření.



Obr.34 - Pozice oblastí zájmu pro měření indexu echogenity. A) axiální thalamická rovina na transkranálním ultrazvukovém snímku; C) mezencefalická rovina; zvětšené detaily ukazují umístění jednotlivých zájmových oblastí: B) nucleus caudatus (2) a nucleus lentiformis (3), D) substantia nigra (8)

Čísla označují následující anatomické struktury: 1 – přední roh postranní komory; 2 – nucleus caudatus; 3 – nucleus lentiformis; 4 – corpus callosum; 5 – epifýza; 6 – inzula; 7 – třetí mozková komora; 8 – SN; 9 – čtvrtá mozková komora; 10 – mozeček; 11 – temporální lalok.

Statistika

Pro testování parametrů s normální distribucí byl použit Shapirov-Wilkův test a výsledná data jsou uvedena jako průměr \pm standardní odchylka (SO). Proměnné, které neodpovídaly normální distribuci, jsou uváděny jako medián s mezikvartilovým rozptylem. K analýze skupinových rozdílů mezi WN, PN a kontrolami byl použit Studentův t-test nebo jednorozměrná ANOVA s post-hoc Tukeyovým testem. Na základě dat získaných z přijímače byla vypočtena senzitivita a specifita pro stanovené mezní body (cut off) echogenity SN, nucleus lentiformis a nucleus caudatus. Závislost proměnných byla hodnocena pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Statistické výpočty byly provedeny pomocí SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, verze 17.0).

4.1.3 Výsledky

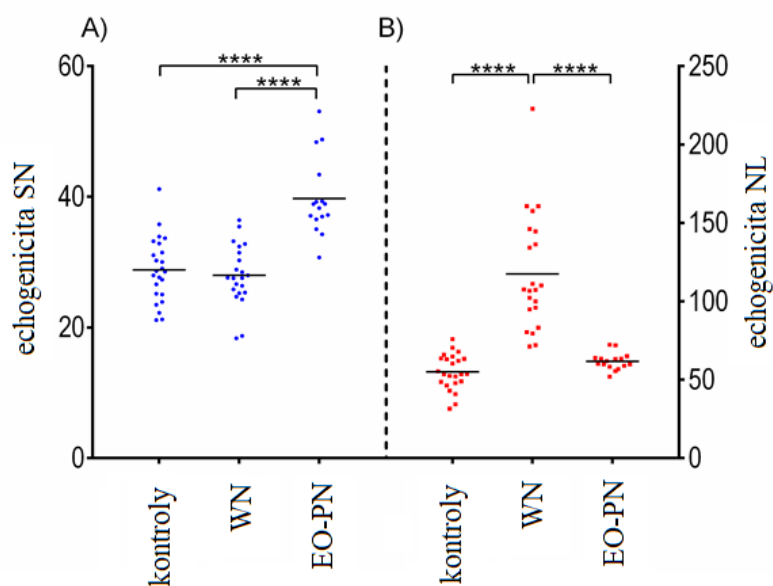
Hodnocení klinického stavu

Soubor tvořilo 22 neurologických pacientů s WN, 16 pacientů s EO-PN a 24 zdravých kontrol. Věkové rozmezí subjektů s EO-PN a WN bylo širší a průměrný věk mírně nižší u kontrolních subjektů (viz Tabulku 4). Na základě předchozích studií však bylo prokázáno, že echogenita SN není na věku závislá, a výsledky tedy tímto rozdílem nebyly výrazněji ovlivněny.

Neurologický nález u 21 pacientů s WN splnil klinická kritéria pro hypokineticko-rigidní syndrom (tj. přítomnost akineze + alespoň jeden z dalších příznaků: rigidita, třes nebo posturální nestabilita). Příznaky hybného postižení byly závažnější ve skupině EO-PN, čemuž odpovídalo i vyšší skóre parkinsonismu ($p < 0.05$). V mozkových strukturách hodnocených TCS nebyly na MR mozku prokázány žádné morfologické změny nad rámec základního onemocnění (např. ischemie, nádor atd.). Žádný z pacientů nevykazoval hypersignální změny v bazálních gangliích v T1 vážených obrazech typické pro depozita manganu.

Transkraniální sonografie

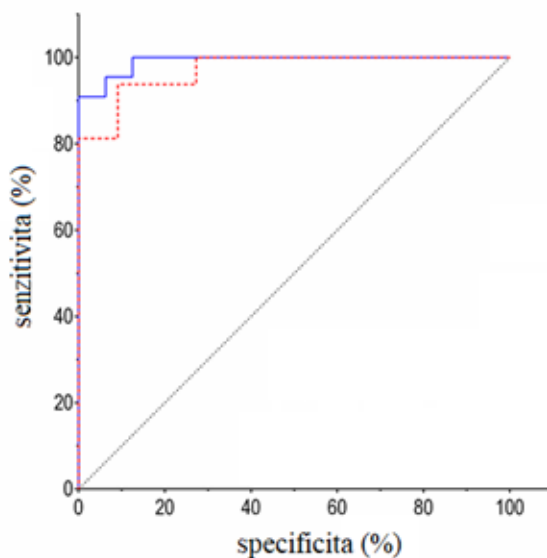
Dle našich očekávání vykazovala skupina EO-PN v porovnání se zdravými kontrolami zvýšenou echogenitu v oblasti SN a skupina s WN v oblasti nucleus lentiformis (viz Obr.35). Skupinová analýza byla významná pro obě zmíněné oblasti mozku: SN ($F [2, 59] = 30.0, p < 0,0001$) a nucleus lentiformis ($F [2,59] = 47.2, p < 0,0001$). Post-hoc Tukeyův test ukázal, že echogenita SN ve skupině EO-PN byla významně vyšší než ve skupinách WN ($p < 0,0001$) a u kontrolních subjektů ($p < 0,0001$). Echogenita nucleus lentiformis byla významně vyšší u pacientů s WN ve srovnání jak s EO-PN ($p < 0,0001$), tak s kontrolami ($p < 0,0001$). Podobné nálezy jako u nucleus lentiformis byly pozorovány také u nucleus caudatus (viz Tabulku 4).



Obr.35 - Index echogenity v A) substantia nigra (SN) a B) nucleus lentiformis (NL) u kontrolních subjektů, pacientů s Wilsonovou nemocí a Parkinsonovou nemocí s časným počátkem. Osy Y jsou různě upraveny pro hodnoty SN a NL. Index echogenity v nucleus caudatus (NC) vykazoval podobný vzorec jako v NL, a proto není v tomto grafu znázorněn.

Mezní hodnota (cut off) pro indexy echogenity byla u SN 33,7 a u nucleus lentiformis 71,9. Pro diferenciaci WN a EO-PN dosáhla hyperechogenita SN senzitivity 93,8 %, specificity 90,9 % a

plochy pod ROC křivkou (AUC) 0,972. Hyperechogenita nucleus lentiformis dosáhla citlivosti 95,5 %, specificity 93,8 % a AUC 0,992 (viz Obr.36).



Obr.36 - Receiver Operating Characteristic (ROC) křivka echogenity v diferenciální diagnostice Wilsonovy nemoci a Parkinsonovy nemoci s časným počátkem: echogenita substantia nigra – přerušovaná čára; echogenita nucleus lentiformis – plná čára

Korelace mezi TCS, MR a klinickým obrazem

Nálezy na TCS u dvou de novo pacientů s WN se nelišily od pacientů s chronickou léčbou (index echogenity nucleus lentiformis 134,2 a 107,5 vs. $117,1 \pm 38,6$, $p = 0,90$). Ve skupině WN jsme nenašli korelaci mezi indexem echogenity nucleus lentiformis a věkem ($r = -0,36$, $p = 0,10$), délkou trvání onemocnění ($r = -0,32$, $p = 0,14$), délkou léčby ($r = -0,21$, $p = 0,36$) nebo UWDRS skórem ($r = 0,36$, $p = 0,10$). Ve skupině PN jsme nezjistili korelaci mezi indexem echogenity SN a věkem ($r = 0,06$, $p = 0,84$), délkou onemocnění ($r = -0,14$, $p = 0,61$) ani UPDRS-III ($r = 0,02$, $p = 0,93$).

Skóre závažnosti postižení MR mozku bylo u WN ve srovnání se skupinou EO-PN vyšší ($p < 0,01$; viz Tabulku 1). MR signál nucleus lentiformis byl normální u 6 pacientů; T2 hyposignální u 12 pacientů; u 13 pacientů byl pak zjištěn vyšší T2 signál v putamen.

Nikdo ze skupiny šesti pacientů s WN s normálním MR signálem neměl normální echogenitu nucleus lentiformis. U pacientů s WN, kteří vykazovali hypersignální změny v putamen, byl index echogenity nucleus lentiformis vyšší v porovnání s podskupinou s normálním nálezem ($140,4 \pm 13,6$ vs $106,9 \pm 8,2$, $p < 0,05$). Na druhé straně, rozdíl v indexu echogenity nucleus lentiformis mezi pacienty s hyposignálním a normálním nálezem v nucleus lentiformis pozorován nebyl ($113,2 \pm 9,5$ vs. $124,5 \pm 12,1$, $p = 0,50$). U 13 pacientů s WN byl přítomen T2 hypointenzní signál v SN a/nebo T2 hyperintenzním signál v mezencefalické bílé hmotě.

Ve skupině EO-PN byla oblast nucleus lentiformis hodnocena jako hypointenzní u 4 pacientů. Hypointenzita SN nebyla nalezena u žádného pacienta z této skupiny.

4.1.4 Diskuze

Výsledky naší studie potvrdily, že indexy echogenity SN a nucleus lentiformis stanovené digitální analýzou snímků z fúze TCS/MR, jsou vysoce specifickými a senzitivními markery v diferenciální diagnostice WN a EO-PN. Mohly by přispívat k usnadnění diferenciální diagnostiky případů s atypickým průběhem.

Nálezy u pacientů s EO-PN byly v souladu s předchozími studii užívanými TCS. Hyperechogenita SN byla detekována v 93,8 % případů a index echogenity nucleus lentiformis byl abnormální pouze u dvou EO-PN pacientů.

V kontrolní skupině byl mírně zvýšený echogenní nález nucleus lentiformis zjištěn u tří subjektů. SN byla hyperechogenní u 10 % zdravých kontrol (což odpovídá všem dosud publikovaným studiím s TCS u PN) bez klinického korelátu. U těchto subjektů nebyla na MR mozku zjištěna vysvětlující ložisková patologie. Jejich potenciální riziko vzniku neurodegenerativních onemocnění je nejasné a budou vyžadovat další sledování v čase.

Při zatím nedostupné specifické preventivní léčbě PN se abnormální nálezy na TCS stávají závažnou etickou otázkou. Hyperechogenita SN je v souladu s dosud zjištěnými poznatky nejspíše rizikovým terénem rozvoje neurodegenerace, zejména PN. Současným trendem je detailnější průzkum ovlivnitelných rizikových faktorů – například dietních opatření nebo aerobní aktivity – o kterých by mohly být osoby v riziku edukovány.

U pacientů s WN byl index echogenity nucleus lentiformis abnormální v 95,5 %. Dalším významným, ale méně konstantním nálezem u pacientů s WN byl zvýšený index echogenity nucleus caudatus. Echogenita SN byla u pacientů s WN srovnatelná s kontrolními subjekty. Poslední zmíněný nález se od dříve publikovaných studií výrazně lišil. Obvykle je popisována >50 % prevalenci hyperechogenity SN u WN.(Walter, Krolkowski et al. 2005, Svetel, Mijajlovic et al. 2012)

Nález normální echogenity u pacientů s WN je překvapivý. Uvážíme-li, že většina z nich byla postižena parkinsonismem, někteří z nich dokonce vážně. Na MR mělo 13 WN pacientů T2 hyposignální nález v oblasti SN a/nebo T2 hyperintenzitu v traktech bílé hmoty mezencefala. Předchozí studie naznačovaly souvislosti mezi parkinsonismem u WN a kombinací presynaptického a postsynaptického poškození nigrostriálních drah.(Barthel, Hermann et al. 2003) Poměr presynaptického a postsynaptického poškození byl v jednotlivých případech vysoce variabilní.(Snow, Bhatt et al. 1991) Parkinsonismus u našich pacientů by tak mohl být způsoben převážně postsynaptickým poškozením.

Pokud jde o změny echogenity nucleus lentiformis a nucleus caudatus, jsou naše výsledky srovnatelné s dříve publikovanými skupinovými studii u pacientů s neurologickou formou WN.(Walter, Krolikowski et al. 2005, Svetel, Mijajlovic et al. 2012) První z nich zachytila hyperechogenitu nucleus lentiformis u 100 %, druhá u 81,6 % pacientů. V obou studiích byla popsána významná korelace mezi závažností klinického nálezu a sonografickým nálezem na bazálních gangliích.(Svetel, Mijajlovic et al. 2012)

Na rozdíl od těchto studií jsme žádnou korelaci mezi změnami echogenity hlubokých mozkových struktur, klinickou závažností a délkou trvání nemoci nebo léčby nenašli. S přihlédnutím k těmto protichůdným výsledkům nelze TCS pravděpodobně použít jako spolehlivý marker pro dlouhodobé sledování chelatační terapie nebo prognózy postižení.(Walter, Dressler et al. 2007)

K inkonzistentním výsledkům TCS může přispívat několik faktorů, z nichž zcela zásadní je subjektivita hodnotícího sonografisty. V naší studii jsme se snažili tento faktor maximálně redukovat. Pro přesnější anatomické vymezení zkoumaných struktur jsme použili technologii fúze MR a TCS v reálném čase a nálezy byly zhodnoceny automatizovaným softwarem pro digitální analýzu echogenity mozkových struktur. Software automaticky zohledňuje kvalitu kostního okna, různé hloubky a odstíny šedi. Použití obou zmíněných technik eliminovalo chybovost při ruční demarkaci struktur a zvýšilo sensitivitu vyšetření.(Blahuta, Soukup et al. 2014, Skoloudik, Jelinkova et al. 2014)

Jak již bylo zmíněno v úvodní části práce, neuropatologický podklad TCS signálových změn není dosud plně objasněn. Jedna ze zvažovaných teorií hromadění železa s odpovídajícími (ferritem a hemosiderem podmíněnými) T2 hypointenzitami na MR(Dusek, Dezortova et al. 2013) se v naší studii nepotvrdila. V rozporu s ní jsme prokázali spojení hyperechogenity nucleus lentiformis spíše s putaminální T2 hyperintenzitou než s T2 hypointenzitou.

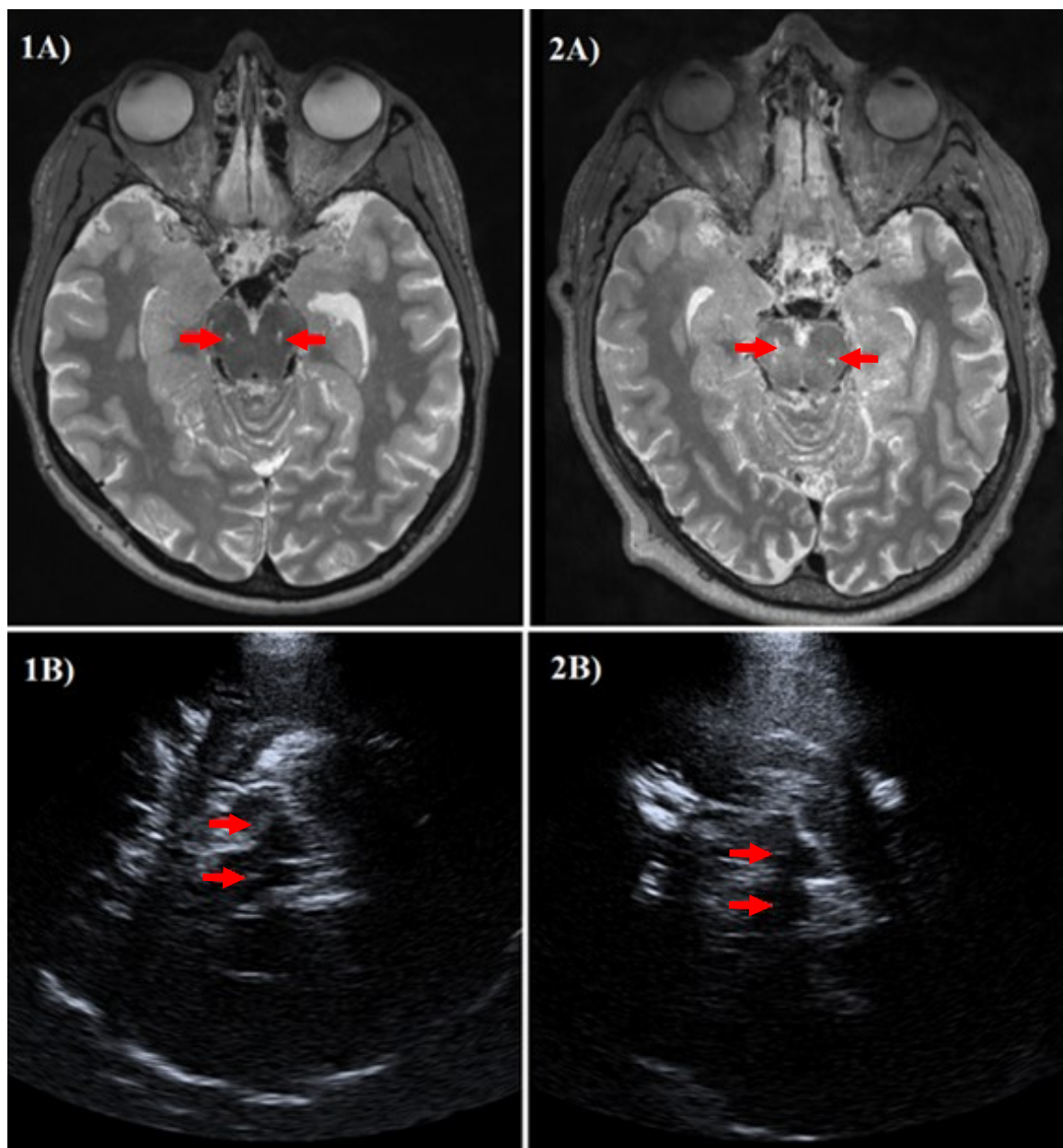
Ve shodě s dříve provedenými studii(Ricciardi, Sirimarco et al. 2010, Martinez-Fernandez, Caballol et al. 2013, Hermann 2014) jsme zjistili abnormální sonografický nálezu nucleus lentiformis u všech pacientů s WN, včetně podskupiny s normálním nálezem na MR mozku. To naznačuje, že TCS zobrazuje jiný mechanismus tkáňových změn. Změny echogenity nucleus lentiformis u WN by mohly být ovlivňovány i jinými kovy. Například mědí, což by bylo v souladu s provedenými neuropatologickými rozbory,(Meenakshi-Sundaram, Mahadevan et al. 2008) nebo manganem, který se u jatrních poruch zvýšeně ukládá v mozku.(Krieger, Krieger et al. 1995, Hayashi, Hattori et al. 2013, Dusek, Roos et al. 2015)

Zvažované vlivy dalších kovů na echogenitu bazálních ganglií nebylo možné v naší studii potvrdit či vyvrátit. Žádný z pacientů s WN na MR nevykazoval změny typické pro akumulaci manganu a měď není na MR spolehlivě zobrazitelná. Ani TCS není schopna rozlišit jednotlivé kovy mezi sebou. Na základě těchto výsledků předpokládáme, že TCS echogenita je kovy ovlivňována spíše sekundárně, souvisejícími mikrostrukturálními patologickými změnami mozkové tkáně.

Fúze s MR nám umožnila u všech pacientů provést také semikvantitativní porovnání ložiskových změn v mezencefalu zaměřených na depozita železa s echogenitou na TCS. Míra ložiskových změn na MR nekorelovala s rozsahem arey echogenity SN. Samotná depozita tedy nemohou být jediným aspektem abnormálních nálezů na TCS. Dalším přínosem fúzního zobrazení byla možnost posouzení zvýšené vaskularizace či rozšíření perivaskulárních prostorů v oblasti mezencefala (viz Obr.37), která je častým zdrojem artefaktů při vyšetření TCS. Není jasné, zda je tato vaskularizace přítomna u některých jedinců fyziologicky nebo jde o sekundární změny indukované lokálním poškozením tkáně, např.: ukládáním kovů. Abnormální cévní distribuce by teoreticky mohla zvyšovat riziko přestupu škodlivých látek přes porušenou hematoencefalickou bariéru. Zhodnocení MR nálezů je předmětem další, dosud nepublikované práce.

Hlavní limitací naší studie byl, s ohledem na vzácnost zkoumaných forem onemocnění, malý počet pacientů. Do finální analýzy jsme zařadili nejen de novo, ale i léčené pacienty s WN, a ne všichni pacienti s WN měli příznaky parkinsonismu. Přesto, při již dříve prokázané nezávislosti echogenity na trvání onemocnění, trvání léčby a klinickém obrazu, neměly tyto limitace na výsledky naší studie vliv.

Na základě námi zjištěných výsledků a předchozích publikovaných studií jsme dospěli k závěru, že TCS nálezy jsou u pacientů s WN a EO-PN charakteristické, a lze je použít jako součást diagnostického procesu. TCS by mohla být užitečným screeningovým nástrojem komplementárním k MR. V budoucnu by mohlo být přínosné zařazení hodnocení echogenity bazálních ganglií do podpůrných diagnostických kritérií pro WN.



Obr.37 – Porovnání strukturálních změn na magnetické rezonanci (MR) a transkranální sonografii u dvou pacientů s Parkinsonovou nemocí: 1A+2A) ložiskové změny na T2 vážené MR, horší vpravo, nejspíše odpovídající perivaskulárním prostorům; 1B) jednostranně výrazně zvýšená echogenicita substantia nigra (SN) neodpovídající rozsahem změnám na MR; 2B) bilaterálně normální nález na SN neodpovídající rozsahem změnám na MR

4.2 Studie II – Analýza digitalizovaného obrazu echogenity inzuly detekované TCS/MR fúzí u pacientů s Wilsonovou nemocí a Parkinsonovou nemocí s časným počátkem

4.2.1 Úvod

TCS je užitečným nástrojem detekce patologických změn mozkového parenchymu, ale v porovnání s MR a výpočetní tomografií (CT) má nízkou prostorovou rozlišovací schopnost a je významně ovlivňována zkušeností sonografisty. (Skoloudik and Walter 2010, Walter and Skoloudik 2014) Tyto nevýhody TCS lze překonat fúzním zobrazováním pomocí virtuální navigace a analýzy digitalizovaného obrazu. (Lagana, Forzoni et al. 2011, Blahuta, Soukup et al. 2014, Skoloudik, Jelinkova et al. 2014). Použití těchto technik zlepšuje nejen hodnocení vizuálně sonograficky běžně detekovaných struktur (bazálních ganglií), ale i struktur okolních, jako je například **inzula**. (Skoloudik, Bartova et al. 2016) Její přesná lokalizace nebyla bez použití fúze možná, proto dosud nebyly provedeny studie hodnotící její echogenitu u různých nemocí.

V této studii jsme za pomoci fúzního zobrazení porovnávali echogenitu inzuly u pacientů s WN, PN s časným počátkem a u zdravých kontrol. Pokusili jsme se objasnit případné typické ložiskové změny nebo klinické příznaky asociované se změnou signálu inzuly.

4.2.2 Metodika

Pacienti

Data pro tuto studii byla získána již během vyšetření v rámci předchozí studie zaměřené na TCS u 22 pacientů s WN a 16 pacientů s EO-PN. (Maskova, Skoloudik et al. 2016) Do analýzy insulární oblasti bylo navíc zařazeno dalších 7 pacientů s PN a 1 s WN (demografická data v Tabulce 5.). Inkluzivní kritéria byla neurologická forma onemocnění u WN a u PN nástup příznaků před 40. rokem věku. V kontrolní skupině bylo 24 zdravých osob bez anamnézy psychiatrického nebo neurologického onemocnění. Podmínkou zařazení do studie bylo bilaterálně dostupné temporální okno. Neurologické postižení bylo hodnoceno obvyklými škálami – UWDRS a UPDRS – na zavedené plné terapii.

Tabulka 5 – Demografická a klinická data a sonografické nálezy

	Pacienti s WN	Pacienti s EO-PN	Kontroly
Počet zařazených pacientů (muži)	22 (11)	21 (10)	24 (8)
Věk; průměr ± SO (roky)	43,8 ± 8,5	42,0 ± 4,5	37,6 ± 10,1
Trvání nemoci; průměr ± SO (roky)	17,2 ± 8,0	7,6 ± 4,8	NA
Trvání terapie; průměr ± SO (roky)	13,5 ± 7,2	3,6 ± 1,7	NA
UPDRS-III subskóre; průměr; medián (mezikvartilový rozptyl)	NA	21,3; 16,0 (12,0-32,0)	NA
UWDRS neurologické subskóre; průměr; medián (mezikvartilový rozptyl)	19,6; 13,5 (7,0-30,5)	NA	NA
L-DOPA ekvivalent; průměr ± SO (mg)	NA	623,4 ± 453,2	NA
Počet pacientů na terapii d-PEN/zinkem/kombinované terapii	7/8/4	NA	NA

d-PEN – d-penicilamin; EO-PN – early-onset Parkinsonova nemoc; SO – standardní odchylka; UPDRS-III – Unified Parkinson's Disease Rating Scale, část III; UWDRS – Unified Wilson's Disease Rating Scale; WN – Wilsonova nemoc

MR mozku

K vyšetření MR mozku byl použit 1.5T přístroj Achieva (Philips, Eindhoven, Nizozemsko) ve stejném nastavení jako u předchozí studie. Oblast insulárního kortexu byla jasně znázorněna v axiálních T2 sekvencích na 68 voxelech v latero-laterálním směru a 10 řezech (očekávaná tloušťka 34 mm v rostro-kaudálním směru).

Stupeň mozkové atrofie byl vizuálně hodnocen jako nepřítomný (0 bodů), mírný (1 bod) nebo těžký (2 body) na následujících 3 místech: (i) mozeček a mozkový kmen, (ii) bazální ganglia a (iii) kůra. Hodnocení provedl zkušený neuroradiolog zaslepený vůči základním diagnózám. Měření šířky třetí komory bylo provedeno na axiálních T2 vážených řezech uprostřed předozadního rozměru, kde bývá komora nejširší. Měření šířky čtvrté komory bylo provedeno na axiálních T2 vážených řezech v místě největší šíře.

Transkraniální sonografie

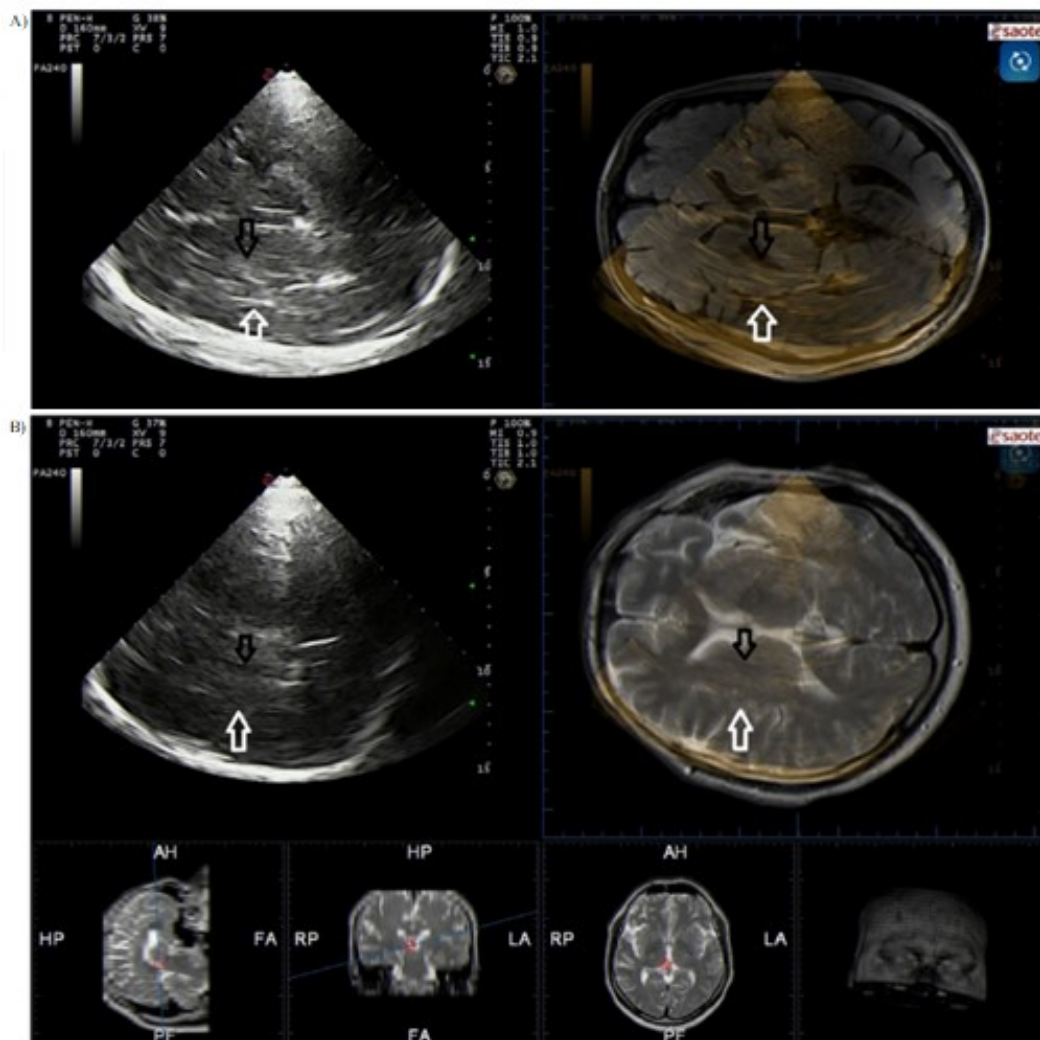
Ultrazvukový systém byl vybaven funkcí **virtuální navigace** (Esaote S.p.A., Janov, Itálie a MedCom GmbH, Darmstadt, Německo), která umožňuje fúzi obrazů TCS a MR v reálném čase. Byl použit ultrazvukový skener Esaote MyLab Twice (Esaote S.p.A.) s 2.5 MHz převodníkem fázového pole (PA240) a 639–039 CIVCO opakovaně použitelným sledovacím držákem (CIVCO, Kalona, IA, USA) k upevnění senzoru. K použití virtuálního navigátoru byl použit elektromagnetický sledovací systém složený z vysílače a malého přijímače namontovaného na ultrazvukovou sondu.

Transkraniální sonografie mozku byla provedena s obvyklými parametry: hloubka penetrace 16 cm, dynamický rozsah 50 dB, frekvence = 14 MHz, mechanický index = 0.9 a následující indexy tkáně: tepelný index pro měkkou tkáň = 1.0, tepelný index pro kosti = 1.0 a tepelný index pro lebeční kosti 2.1. U všech pacientů bylo vyšetření provedeno se stejným nastavením.

Pro měření indexů echogenity byl použit automatizovaný software B-Mode Assist s možností umístění předdefinovaných specifických eliptických oblastí zájmu (ROI): pro inzulu (plocha: 196 mm²), SN (plocha: 50 mm²), nucleus lentiformis (plocha: 200 mm²), nucleus caudatus (plocha: 140 mm²) a nuclei raphe (plocha: 40 mm²). (Blahuta, Soukup et al. 2014, Skoloudik, Jelinkova et al. 2014, Silhan, Jelinkova et al. 2015, Maskova, Skoloudik et al. 2016)

Pro finální analýzu byla použita vyšší ze dvou naměřených hodnot pro každou strukturu. Reprodukovatelnost měření indexu echogenity inzuly byla vypočtena v dřívější studii a dosáhla intra-rater/inter-rater korelačních koeficientů 0.995 (95 % interval spolehlivosti [CI]: 0.9930.997) / 0.937 (95 % CI: 0.9100.956) a Spearmanova korelačního koeficientu $r = 0.993/r = 0.921$ (Skoloudik, Bartova et al. 2016).

Po nahrání obrázků MR ve formátu DICOM do virtuálního navigátoru, bylo u všech pacientů na obličeji označeno 11 orientačních bodů (8 základních a 3 doplňkové pro finální doladění fúze). Pro porovnání s MR zobrazením inzulární oblasti byla použity ultrazvukové snímky v transverzálním řezu v axiální talamické rovině (viz Obr.38).



Obr.38 – Fúze transkraniální sonografie a magnetické rezonance v thalamické rovině: A) zvýšená echogenita nucleus lentiformis a inzuly u pacienta s Wilsonovou nemocí ; B) normální echogenita nucleus lentiformis a inzuly u pacienta s Parkinsonovou nemocí s časným počátkem

Statistika

Velikost vzorku pro studii byla založena na očekávaném 30 % rozdílu v indexu echogenity inzuly mezi jednotlivými skupinami. Výpočty provedené před zahájením ukázaly nutnost zařazení nejméně 23 pacientů v každé skupině, aby se dosáhlo statisticky významného rozdílu, za předpokladu, že 10 % z těchto pacientů (2 pacienti) by bylo vyloučeno z důvodu neprostupnosti kostního okna.

Pro testování normality byl použit Shapirův-Wilkův test. Data s normální distribucí jsou uváděna ve formátu průměrné hodnoty a směrodatné odchylky. Nepravdělně distribuované proměnné jsou prezentovány jako medián s mezikvartilovým rozptylem. Srovnání mezi dvěma skupinami bylo provedeno Mannův-Whitneyův U testem. Pro porovnání mezi všemi třemi skupinami byl použit Kruskalův-Wallisův test, následovaný Bonferroniho testem pro vícenásobné porovnání. Rozdíly mezi skupinami WN, EO-PN a kontrolními skupinami byly vyhodnoceny jednosměrnou analýzou rozptylu.

Závislost proměnných byla hodnocena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Pro potřeby statistického hodnocení byla použita bilaterální měření inzuly, SN, nucleus caudatus a nucleus lentiformis. Všechny popsané hodnoty p jsou získány dvoustranným testem (two-tailed). Všechny testy byly provedeny na hladině významnosti 0,05. Data byla analyzována pomocí softwaru SPSS v.22.0 (IBM Corp. Armonk, NY, USA).

4.2.3 Výsledky

Ze 70 vyšetřených subjektů byly tři (1 pacient s WN a 2 pacienti s EO-PN) z analýzy vyloučeni kvůli neprostupnému kostnímu oknu.

Echogenita inzuly byla vyšší u pacientů s WN ($103,92 \pm 34,94$) ve srovnání s pacienty s EO-PN ($73,64 \pm 15,70$; $p = 0,030$) a se zdravými kontrolami ($64,82 \pm 24,60$; $p < 0,001$). Průměrný index echogenity inzuly se mezi muži a ženami významně nelišil ($79,99 \pm 29,07$ vs. $80,78 \pm 32,81$; $p = 0,919$).

Rovněž indexy echogenity nucleus lentiformis a nucleus caudatus byly vyšší u pacientů s WN ($109,10 \pm 36,30$ a $48,70 \pm 21,00$) ve srovnání s pacienty s EO-PN ($62,60 \pm 8,62$, $p < 0,001$ a $39,52 \pm 7,32$; $p = 0,010$) a zdravými kontrolami ($p = 0,010$) $54,60 \pm 14,06$; $p < 0,001$ a $33,11 \pm 8,78$; $p = 0,001$). Index echogenity SN byl vyšší u pacientů s EO-PN ($38,01 \pm 8,65$) ve srovnání s pacienty s WN ($27,38 \pm 5,60$; $p < 0,001$) a zdravými kontrolami ($29,47 \pm 5,27$; $p < 0,001$). Kompletní výsledky jsou shrnuty v Tabulce 6.

Šířka třetí komory byla větší u pacientů s WN ($7,84 \pm 2,70$ mm) ve srovnání s pacienty s EO-PN ($3,98 \pm 1,37$ mm; $p = 0,016$) a zdravými kontrolami ($2,94 \pm 0,54$ mm; $p = 0,002$). Příznaky kortikální, subkortikální a cerebelární atrofie na MR byly u zdravých kontrol významně méně časté než u neurologických pacientů ($p < 0,001$ ve všech případech). Mezi subjekty s EO-PN a WN nebyly v zastoupení atrofie zjištěny žádné významné rozdíly ($p = 0,667$, $p = 0,105$ a $p = 0,051$).

Tabulka 6 – Transkraniální sonografie a nálezy na MR u pacientů s WN, EO-PN a kontrol

	pacienti s WN (22 pacientů)	p-hodnota (WN vs EO-PN)	pacienti s EO-PN (21 pacientů)	p-hodnota (EO-PN vs. KO)	kontroly (24 pacientů)	p-hodnota (WN vs. KO)
Transkraniální sonografie						
Index echogenicity insuly průměr ± SO	103.92 ± 34.94	0.030	73.64 ± 15.70	0.379	64.82 ± 24.60	<0.001
Hyperechogenní insula (>99. percentil v populaci); n (%)	16 (72.7 %)	<0.001	1 (4.76 %)	0.984	1 (4.17 %)	<0.001
Index echogenicity SN průměr ± SO	27.38 ± 5.60	<0.001	38.01 ± 8.65	<0.001	29.47 ± 5.27	0.475
Hyperechogenní SN (>90. percentil v populaci); n (%)	3 (13.6 %)	<0.001	17 (81.0 %)	<0.001	2 (8.3 %)	0.741
Index echogenicity NL průměr ± SO	109.10 ± 36.30	<0.001	62.60 ± 8.62	0.993	54.60 ± 14.06	<0.001
Hyperechogenní NL (>99. percentil v populaci); n (%)	17 (77.3 %)	<0.001	0 (0 %)	1.000	0 (0 %)	<0.001
Index echogenicity NC průměr ± SO	48.70 ± 21.00	0.010	39.52 ± 7.32	0.440	33.11 ± 8.78	<0.001
Hyperechogenní NC (>99. percentil v populaci); n (%)	6 (27.3 %)	0.124	0 (0 %)	1.000	0 (0 %)	0.112
Index echogenicity NR průměr ± SO	28.74 ± 4.92	0.531	31.67 ± 5.06	0.894	30.12 ± 5.12	0.697
Hyperechogenní NR (<5. percentil v populaci); n (%)	1 (4.5 %)	1.000	1 (4.8 %)	0.849	2 (8.3 %)	0.834
Magnetická rezonance						
Šíře třetí komory; průměr ± SO	7.84 ± 2.70	0.016	3.98 ± 1.37	1.000	2.94 ± 0.54	0.002
Šíře čtvrté komory; průměr ± SO	2.11 ± 0.52	0.563	2.00 ± 0.43	0.388	1.86 ± 0.23	0.168
Kortikální atrofie - nepřítomna/mírná/závažná; n (%)	9(40.9)/7(31.8)/6(27.3)	0.667	7(33.3)/13(61.9)/1(4.8)	<0.001	24(100)/0(0)/0(0)	<0.001
Subkortikální atrofie - nepřítomna/mírná/závažná; n (%)	6(27.2)/8(36.4)/8(36.4)	0.105	10(47.6)/8(38.1)/3(14.3)	<0.001	24(100)/0(0)/0(0)	<0.001
Mozečková atrofie - nepřítomna/mírná/závažná; n (%)	4(18.2)/11(50.0)/7(31.8)	0.051	9(42.9)/9(42.9)/3(14.2)	<0.001	24(100)/0(0)/0(0)	<0.001

WN - Wilsonova nemoc; EO-PN - early-onset Parkinsonova nemoc; KO - kontroly; SO - směrodatná odchylka; SN - substantia nigra; NL - nucleus lentiformis; NC - nucleus caudatus; NR - nucleus raphe

Index echogenity inzuly u pacientů s EO-PN nekoreloval s věkem, indexem echogenity nucleu raphe ani se šířkou komor. U pacientů s WN koreloval insulární index echogenity s indexem echogenity nucleu lentiformis. Korelace s věkem, trváním onemocnění nebo závažností symptomů stanovených pomocí UWDRS se však nepotvrdila. (viz Tabulku 7).

Tabulka 7. – Korelace mezi indexem echogenity inzuly a vybranými parametry

		Index echogenicity insuly		Index echogenicity insuly			
		Spearmanův korelační koeficient r	p hodnota	Spearmanův korelační koeficient r	p hodnota		
Všichni pacienti	Věk	-0,01341	0,91423	WN pacienti	Věk	-0,13834	0,53924
	Index echogenicity NR	-0,23556	0,05499		Trvání nemoci	-0,36091	0,09891
EO-PN pacienti	Věk	-0,13385	0,56296	UWDRS	0,27922	0,20824	
	Trvání nemoci	0,0595	0,79781	Index echogenicity NL	0,74816	0,00006	
	UPDRS-III	-0,0883	0,74504	Index echogenicity NC	0,2716	0,22145	
	Index echogenicity SN	0,06623	0,77545	Šířka třetí mozkové komory	0,07064	0,75475	
	Šířka třetí mozkové komory	-0,12602	0,58622	Šířka čtvrté mozkové komory	0,12415	0,58200	
	Šířka čtvrté mozkové komory	0,28106	0,21714	Kortikální atrofie	0,11762	0,60216	
	Kortikální atrofie	-0,19645	0,39339	Subkortikální atrofie	0,05641	0,80310	
	Subkortikální atrofie	0,18464	0,42300				

NR - nucleus raphe; NC - nucleus caudatus; EO-PN - Early-onset Parkinsonova nemoc; NL - nucleus lentiformis; SN - substantia nigra; UPDRS-III - Unified Parkinson's Disease Rating Scale, část III; UWDR - Unified Wilson's Disease Rating Scale; WN - Wilsonova nemoc

4.2.4 Diskuze

Výsledky této studie ukazují, že pacienti s WN a EO-PN se liší nejen z hlediska echogenity SN a nucleus lentiformis, ale v i nálezech v inzule. Skupina s WN měla jako jediná abnormální sonografický nález v nucleus lentiformis i inzule. Mezi echogenitou obou struktur byla navíc pozorována silná pozitivní korelace. Tyto výsledky ukazují, že echogenita inzuly může být použita jako další diagnostický marker pro rozlišení mezi WN a PN s časným počátkem.

Jak již bylo diskutováno výše, změny echogenity jsou nejspíše multifaktoriální povahy. Kromě vlivu kovů a lokálních změn tkání může být echogenita ovlivňována také dalšími patologickými procesy, jako je fokální mozková atrofie.(Yilmaz, Pilotto et al. 2017) V případě abnormálního sonografického nálezu na inzule je zvažovaným faktorem difúzní kortikální a subkortikální atrofie. Ta byla na MR u pacientů s WN popsána častěji než u pacientů s EO-PN a u zdravých kontrol. Její vizuálně hodnocená MR závažnost však s echogenitou inzuly nekorelovala. Stanovení podílu atrofie a kumulace kovů na TCS změnách by vyžadovalo další kvantitativní MR studie s volumetrickou analýzou a sekvencemi citlivými na depozita kovů.

Neuropatologické studie u WN prokázaly, že hyperechogenita nucleus lentiformis koreluje s putaminální koncentrací mědi, ale nikoli s obsahem železa.(Walter, Skowronska et al. 2014) Hromadění mědi a nasedající patologické procesy by tedy mohly vést ke změnám nejen na úrovni nucleus lentiformis, ale i v inzulách. Obsah mědi ani železa v oblasti inzuly nebyl ve studii uveden, protože dosud nebyla tato struktura předmětem zájmu TCS. S narůstajícím zájmem o uplatnění TCS v neurologii, se zlepšujícími se možnostmi zobrazení a fúze se dá očekávat zkoumání dalších nových mozkových struktur.

Tato studie měla několik limitací. Zejména nízký počet pacientů, který byl dostatečný pro potřeby vyhodnocení rozdílů v echogenitě inzuly mezi jednotlivými skupinami, ale pro podrobnější stanovení vlivu dalších faktorů na TCS by bylo nutné jeho rozšíření. Další limitací je, že senzitivita a specificita hyperechogenity inzuly při diagnostice WN by měla být primárně stanovena ve studii s větším počtem dosud neléčených pacientů.

Závěrem lze shrnout, že fúzní zobrazování TCS s MR prokázalo u pacientů s WN, ve srovnání s pacienty s PN a zdravými kontrolami, zvýšenou echogenitu inzuly. Důvod zvýšené echogenity inzuly u pacientů s WN nebyl v naší studii objasněn, mohou se na ní tedy podílet všechny již dříve zmíněné faktory. Zjištěná silná korelace mezi změnami v inzule a nucleus lentiformis nicméně naznačuje, že patologický proces v obou lokalizacích bude identický. K lepšímu pochopení dynamiky vývoje echogenity inzuly u WN v čase by bylo nutné sériové TCS vyšetření.

4.3 Studie III – Srovnávací studie echogenity substantia nigra a SPECT s ¹²³I-ioflupanem u pacientů se synukleinopatií s poruchou chování v REM spánku a bez ní

4.3.1 Úvod

Idiopatická forma RBD (iRBD) je onemocněním manifestujícím se motorickým či verbálním prožíváním snů s poruchou atonie v REM fázi spánku. Je známa také jako prodromální fáze synukleinopatií (Postuma, Gagnon et al. 2013, Postuma 2014, Hogl, Stefani et al. 2018) jako jsou PN, DLB (Walter, Dressler et al. 2006, Favaretto, Walter et al. 2016) nebo MSA. V mnoha předchozích studiích byla popsána konverze do neurodegenerace u 38-68 % iRBD subjektů (Iranzo, Molinuevo et al. 2006, Stockner, Iranzo et al. 2009, Postuma and Montplaisir 2010) avšak s prodlužujícím se časem sledování se procento konverzí výrazně zvýšilo až na 90 % po 14 letech od vzniku prvních příznaků RBD (Iranzo, Fernandez-Arcos et al. 2014, Galbiati, Verga et al. 2019, Postuma 2019, Postuma, Iranzo et al. 2019). Pravděpodobnost konverze se zvyšuje také v přítomnosti dalších rizikových faktorů, jako jsou kognitivní deficit, hyposmie nebo abnormální **DAT-SPECT** (*dopamine transporter-single photon emission computed tomography*) (Jennings, Siderowf et al. 2017).

Právě poslední zmiňovaná metoda je vnímána jako zlatý standard hodnocení ztráty dopaminergních receptorů nigrostriatální dráhy u prodromálních i manifestních synukleinopatií (Shih, Hoexter et al. 2006). Během fyziologického procesu stárnutí dochází k úbytku 6-7 % receptorů ročně, u PN dosahuje roční úbytek hodnot 6-13 % (van Dyck, Seibyl et al. 1995, Shih, Hoexter et al. 2006). Pokles pod 65 % věkově očekávané hodnoty počtu dopaminergních receptorů je rizikovým faktorem rozvoje PN (Jennings, Siderowf et al. 2017). Snížení vazebných indexů radiofarmaka ve striatu (*striatal binding ratio, SBR*) bývá u PN asociováno se závažností motorického deficitu, zejména s bradykineziou a rigiditou (Spiegel, Hellwig et al. 2006).

DAT-SPECT je u pacientů s iRBD užitečným markerem časné konverze do manifestní synukleinopatie (Iranzo, Molinuevo et al. 2006). Jeho přínos v odhalování osob v riziku je výrazně zvyšován kombinací s dalšími vyšetřovacími metodami, zejména s TCS. Při abnormálním nálezů na obou zobrazovacích metodách se riziko konverze během následujícího 2,5 roku zvyšuje až na 100 % (Iranzo, Molinuevo et al. 2006).

U iRBD subjektů byla opakovaně popsána hyperechogenita SN, i když s nižší prevalencí ve srovnání s PN (Stockner, Iranzo et al. 2009, Iwanami, Miyamoto et al. 2010, Miyamoto and Miyamoto 2013, Iranzo, Santamaria et al. 2017). Výsledky předchozích studií hodnotících změny na TCS u iRBD však nebyly konzistentní. Hodnoty SN se pohybovaly v širokém rozmezí 0,16-0,28 cm² u iRBD a 0,06-0,176 cm² u zdravých kontrol. Zastoupení abnormálních TCS nálezů v obou skupinách se mezi studiemi výrazně lišilo (10-29 % abnormálních nálezů u kontrol a 34-63 % u iRBD) (Stockner, Iranzo

et al. 2009, Iranzo, Lomena et al. 2010, Miyamoto and Miyamoto 2013, Shin, Joo et al. 2013, Iranzo, Stockner et al. 2014, Vilas, Iranzo et al. 2015, Noyce, Dickson et al. 2018)

Zajímavostí je, že pacienti s iRBD ani po fenokonverzi do klinicky manifestní synukleinopatie nedosahují hodnot SN arey popisovaných u PN. Přítomnost symptomu RBD reprezentuje nejspíše „maligní“ podtyp synukleinopatií, u kterých se častěji objevuje demence, poruchy chůze nebo ortostáza.(Romenets, Gagnon et al. 2012, Liu, Zhu et al. 2017) Pacienti s PN a komorbiditou RBD (PD+RBD) mívají při DAT-SPECT výraznější úbytek dopaminergních neuronů. Dosud však nebylo jasné, zda mají také specifický sonografický nález.

Ačkoli TCS i SPECT zobrazují degeneraci SN, jejich dlouhodobá dynamika vývoje se značně liší. Zatímco ztráta dopaminergních neuronů u PN je v čase progresivní, sonografický nález zůstává v čase stacionární.(Berg 2006) Většina publikovaných studií u PN neprokázala korelaci nálezu na SPECT s hyperechogenitou SN.(Spiegel, Hellwig et al. 2006, Dusek, Roos et al. 2015)

Ve studii jsme se zaměřili na mezeru ve znalostech ohledně vztahu mezi komorbiditou RBD a nálezy na TCS u synukleinopatie. **Naším cílem** bylo: 1) porovnat echogenitu SN u kontrolních subjektů, iRBD, PN bez RBD (PD-noRBD) a PN s RBD (PD+RBD); 2) zjistit asociaci mezi degenerací SN na DaTscanu a na TCS; a 3) vyšetřit souvislost mezi echogenitou SN a klinickou závažností motorických příznaků.

4.3.2 Metodika

Pacienti

Do studie bylo zahrnuto 61 pacientů s iRBD, 44 pacientů s nově diagnostikovanou PN a 120 zdravých dobrovolníků bez předchozí anamnézy neurologického nebo psychiatrického onemocnění. Podobná demografická data jsou uvedena v Tabulce 8.

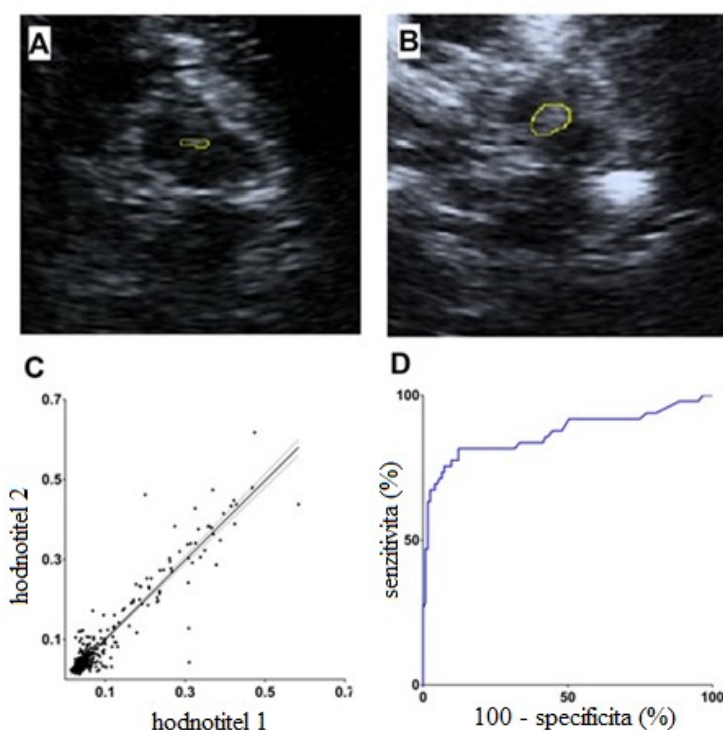
Diagnóza iRBD byla stanovena na základě výsledku **polysomnografie**, odpovídají kritériím Americké akademie spánkové medicíny ICSD-3 (*International Classification of Sleep Disorders, 3.edice, Darien, IL 2014*). Pacienti s nově diagnostikovanou PN splňovali klinická kritéria MDS (*Movement disorder society*) a byli lékově naivní.(Postuma, Berg et al. 2015, Postuma, Poewe et al. 2018) Obě skupiny absolvovaly spánkové vyšetření, TCS a DAT-SPECT. Neurologický nález byl hodnocen specialisty na extrapyramidovou problematiku oficiální škálou užívanou u PN (MDS-UPDRS).(Goetz, Tilley et al. 2008)

Do finální analýzy dat byli zařazeni pouze pacienti se sonograficky bilaterálně prostupnými temporálními okny s vyloučenou strukturální patologií na MR mozku. Na základě výsledku polysomnografie byli pacienti s PN k dalším analýzám rozděleni podle přítomnosti či absence RBD projevů (PD-noRBD vs. PD+RBD).

Vylučovacím kritériem u iRBD byl přítomný klinicky manifestní parkinsonismus a kognitivní deficit tíže demence. Vyloučeny byly také subjekty se známou sekundární etiologií RBD, ať už léky indukovanou (např. antidepresivy), vycházející z jiné spánkové diagnózy (např. narkolepsie) nebo ze strukturální léze v oblasti kmene.

Transkraniální sonografie

K vyšetření jsme použili sonografický přístroj **Toshiba Aplio 300** s 2,5MHz převodníkem fázového pole. Ultrazvukové vyšetření bylo provedeno při standartním nastavení. Oblast SN byla hodnocena v klasickém mezencefalickém axiálním řezu (viz Obr.39). Všechny subjekty byly vyšetřeny při totožném nastavení, bez úprav kontrastu obrazu u pacientů s hůře prostupnými okny, což mohlo podmínit vyšší procento nehodnotitelných subjektů.



Obr.39 - Hodnocení transkraniální sonografie: hyperechogenní substantia nigra (SN) v hypoechogenním motýlovitém tvaru mezencefala: A) normální nález na SN (typický pro zdravé kontroly); B) zvýšená echogenita SN (typická pro Parkinsonovu nemoc); C) bodový graf porovnávající hodnocení arey SN (cm²) od obou hodnotitelů; D) specifickita a senzitivita při rozlišování Parkinsonovy nemoci a kontrol pomocí cut-off hodnoty 0.126 cm²

Všechna sonografická vyšetření byla prováděna jedním zkušeným sonografistou, který byl zaslepen vůči diagnóze. Pro následnou analýzu SN arey byly snímky převedeny do formátu DICOM. Hodnocení bylo prováděno dvěma nezávislými hodnotiteli v programu **ImageJ** (NIH, MD, USA). Spolehlivost výsledků jednotlivých hodnotitelů byla ověřena korelačním koeficientem ($r^2= 0,87$; p

<0,001; viz Obr.39C). K analýze byla použita strana s vyšší echogenitou bez ohledu na klinický obraz či výsledky DAT-SPECT.

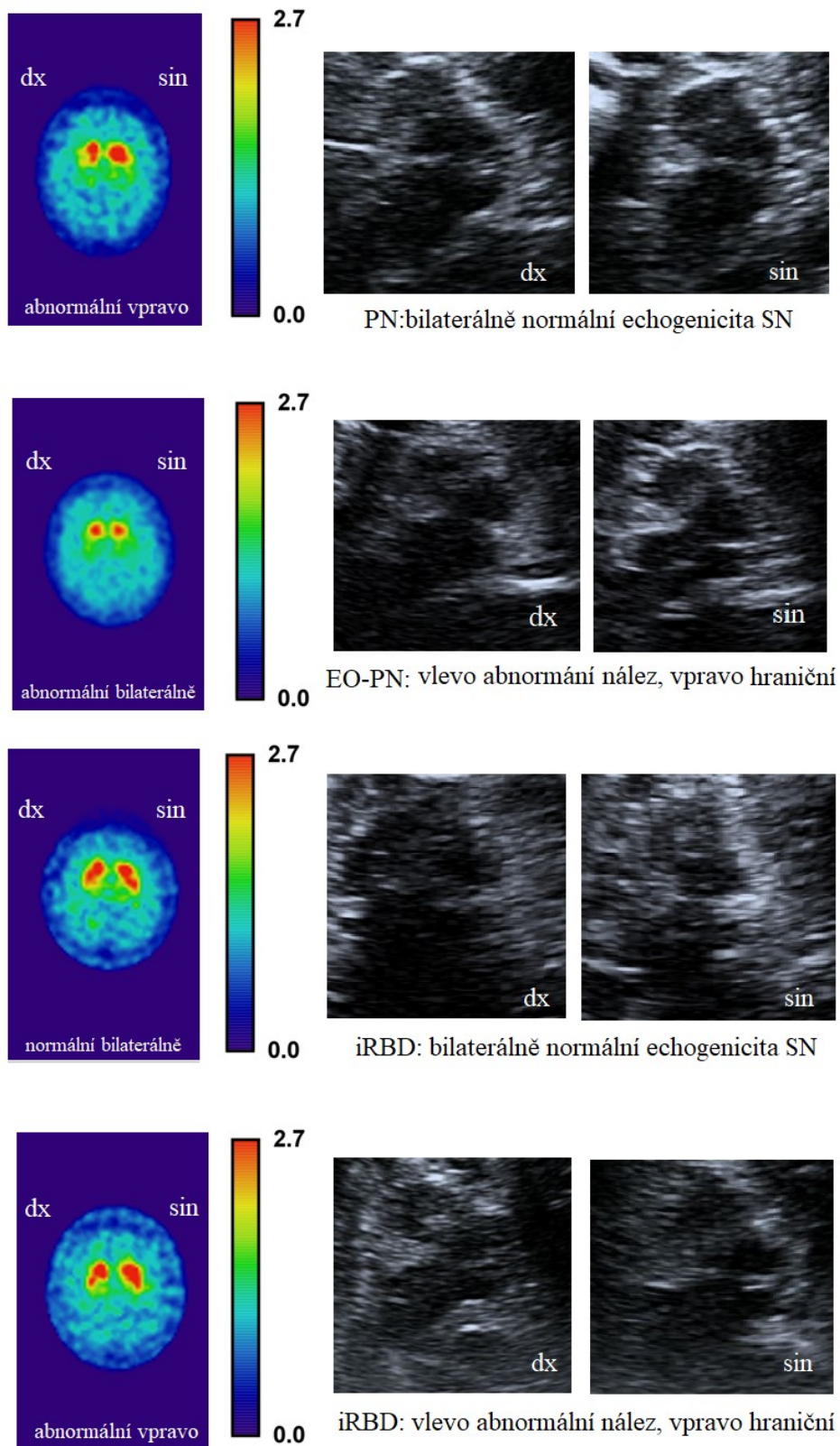
Ke stanovení cut off jsme použili výpočet ROC zdravé kohorty a pacientů s PN. Při použití optimálního cut off ($0,126 \text{ cm}^2$) jsme v diferenciaci mezi PN a kontrolní skupinou dosáhli senzitivity 75,5 % a specifity 92,7 % ($p < 0,0001$; viz Obr.39D).

Procento subjektů, u kterých nebylo bilaterálně prostupné temporální okno, bylo ve skupině iRBD 24 % ($n=19$) a u PN 25 % ($n = 15$), což je mírně vyšší ve srovnání s obvyklé publikovaným rozmezím 5-20 % (Stockner, Iranzo et al. 2009, Iranzo, Lomena et al. 2010, Fernandes Rde, Rosso et al. 2011, Shin, Joo et al. 2013, Iranzo, Stockner et al. 2014). U kontrol nebylo možné TCS hodnotit u 3,3 % ($n = 23$). Tyto subjekty nebyly zahrnuty do následných analýz a nejsou uvedeny v tabulkách.

DAT SPECT

Při vyšetření DAT-SPECT byl analogicky k předchozím studiím věnujících se RBD (Dusek, Ibarburu et al. 2019) použit $[^{123}\text{I}]-2\text{-b-carbomethoxy-3b-(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl)}$ nortropan (**[^{123}I]FP-CIT, DaTscan®, GE Healthcare**). Roztok v dávce odpovídající přibližně 185 MBq byl podán intravenózně a skeny byly snímány 3 hodiny po podání na dvouhlavé kameře systému Infinia, GE Healthcare. Nastavené parametry byly následující: poloměr rotace 13-15 cm, matice obrazu 128×128 , úhlové vzorkování se 120 projekcemi v intervalu 3° a 40 sekund za snímek, zoom 1.3, energetické okno $159 \pm 10 \text{ keV}$. Rekonstrukce získaných snímků byla provedena s použitím algoritmu OSEM (ordered subset expectation maximization) s 8 iteracemi a 10 podmnožinami včetně Changovy korekce útlumu ($\mu = 0,11 \text{ cm}^{-1}$) a následného Butterworthova 3D filtrování s FWHM = 8 mm.

Automatizovaná semikvantitativní analýza byla provedena pomocí **softwaru BasGan V2** (<https://www.aimn.it/site/page/gds/gds-5>). Pro každou hemisféru byly, s korekcí na referenční oblast v týlním laloku, vypočítány striatální vazebné poměry (SBR) pro nucleus caudatus a pro putamen. Následně byla u 97 zdravých subjektů, již zanesených v BasGan V2 softwaru, a dalších 32 kontrol provedena lineární regrese SBR caudata/putamen a věku, a byl vypočítán 95 %, jednostranně predikční interval. K analýze byl použit nižší putaminální SBR z obou hemisfér. Jako abnormální byly na DAT-SPECT hodnoceny SBR <95 %. Získané DAT-SPECT skeny byly použity k porovnání s TCS (viz Obr.40).



Obr.40 – Porovnání echogenicity SN arey na transkraniální sonografii a DAT-SPECT u vybraných subjektů i idiopatickou poruchou chování v REM spánku (iRBD) a Parkinsonovou nemocí (PN, EO-PN)

Statistika

Normální rozdělení hodnot bylo testováno D'Agostino-Pearsonovým testem normality. Pro porovnání jednotlivých skupin byly použity Studentův t-test, Mann-Whitney U test, jednorozměrná ANOVA, Kruskal-Wallis nebo obecný lineární model s ohledem na věk a pohlaví. Post-hoc testy byly pro vícenásobná srovnání podle potřeby opraveny pomocí HSD („*honestly*“ *significant difference test*). Kontingenční analýzy byly provedeny Pearson Chi-kvadrátovým nebo Fischerovým exaktním testem. Pro posouzení asociace mezi proměnnými byly použity Pearsonův korelační koeficient nebo parciální korelační koeficient pro věk a pohlaví. Všechny statistické výpočty byly prováděny v programu Statistica (*StatSoft, verze 12*) a v Graphpad Prism (*Graphpad software, San Diego, CA, USA, verze 6.07*).

4.3.3 Výsledky

Hodnocení klinického stavu

Průměrný věk subjektů s idiopatickou RBD byl v porovnání s pacienty s PN a zdravými kontrolami mírně vyšší ($p < 0,001$) a lišilo se také zastoupení jednotlivých pohlaví ($p < 0,003$). Klinický nález byl u pacientů hodnocen pomocí motorického subskóre škály **MDS-UPDRS III**. U pacientů s PN byl významně vyšší v porovnání s iRBD ($p < 0,0001$).

Tabulka 8 – Demografické údaje

	skupina PN	skupina iRBD	kontrolní skupina	p-hodnota
Počet pacientů (ženy)	44 (13)	61 (4)	120 (44)	-
Průměrný věk \pm SO (roky)	56,3 \pm 12,4	66,4 \pm 8,1	55,5 \pm 12,2	< 0,001*
Průměrná doba trvání subjektivních příznaků \pm SO (roky) *	2,3 \pm 1,6	8,1 \pm 9,0	-	-
Průměrný interval mezi diagnózou RBD a vyšetřením TCS \pm SO (roky)	-	0,69 \pm 0,99	-	-
SN area; medián \pm mezikvartilový rozdíl; průměr \pm SO* (cm ²)	0,27 \pm 0,22; (0,23 \pm 0,13)	0,07 \pm 0,07; (0,11 \pm 0,11)	0,05 \pm 0,03; (0,06 \pm 0,05)	< 0,003**
Průměrné MDS-UPDRS-III subskóre \pm SO	28,5 \pm 13	6,4 \pm 6,0	N.D.	< 0,0001

* Jednorozměrná ANOVA, HSD post-hoc signifikantní pro iRBD vs kontroly a PN vs iRBD
** Jednorozměrná ANOVA, HSD post-hoc test signifikantní pro PN vs. kontroly ($p < 0,0001$); PN vs. iRBD ($p < 0,0001$); a iRBD vs. kontroly ($p < 0,003$)
* Pro porovnání s předchozími studiemi v závorce udána průměrná hodnota
* Trvání motorických příznaků u PN a poruchy chování ve spánku u iRBD

PN – Parkinsonova nemoc; iRBD – idiopatická forma poruchy chování v REM spánku; SO – směrodatná odchylka; SN – SN; MDS-UPDRS-III – Movement Disorder Society. Unified Parkinson's Disease Rating Scale. motorické subskóre; N.D. – nebylo dostupné

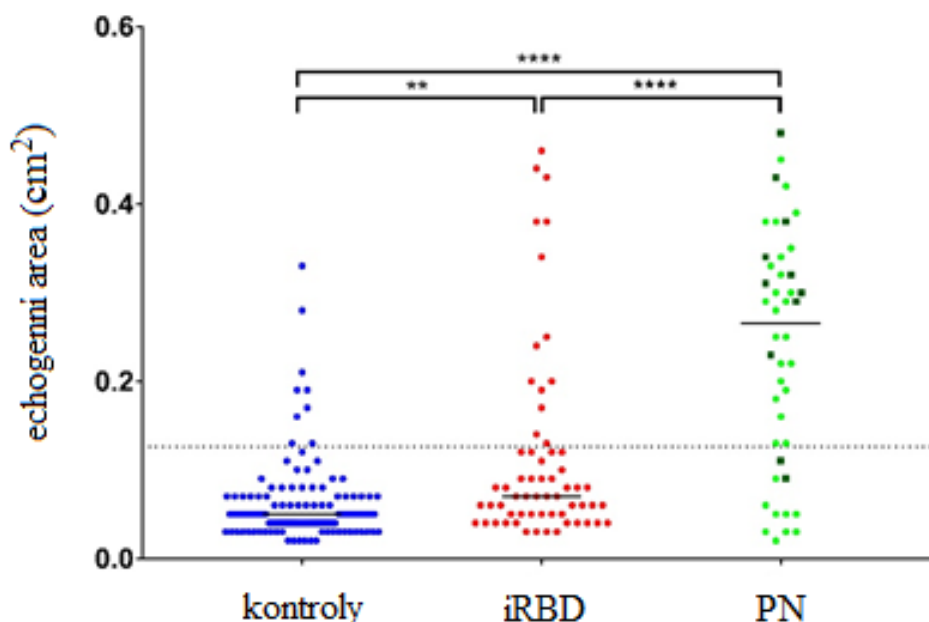
DAT-SPECT

Abnormální pokles putaminálního SBR byl přítomný u 25,4 % (n=16) pacientů s iRBD a u všech pacientů s PN (n=44). I po korekci na věk a pohlaví byl SBR putamina z více postižené hemisféry u pacientů s iRBD signifikantně vyšší (tedy méně alterovaný) než u obou podskupin s PN (PD-noRBD, PD+RBD [$<0,0001$]). Stejný výsledek přinesla i analýza SBR caudata porovnávající iRBD a podskupiny PN (PD-noRBD, PD+RBD [$<0,0004$]). Navíc bylo zjištěno, že SBR caudata byl u podskupiny PD+RBD nižší než u PD-noRBD ($<0,0004$). Všechny výsledky jsou podrobně shrnuty v Tabulce 9.

Transkraniální sonografie

Abnormální SN area byla přítomna u 75,5 % pacientů s PN, u 23 % iRBD a u 7,3 % kontrol. Kontingenční analýzy potvrdily signifikantně vyšší výskyt abnormálního nálezu u pacientů s iRBD v porovnání se zdravými subjekty (OR 4,22 [95% interval spolehlivosti 1,75 – 10,22], $p = 0,0007$).

Kvantitativní analýza ukázala, že SN area u PN byla signifikantně větší jak v porovnání s iRBD, tak s kontrolami ($p < 0,0001$). Vyšší SN area byla zjištěna také u iRBD v porovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,003$; viz Obr.41). Podrobnější analýza srovnávající iRBD pacienty s kontrolní podskupinou po věkové korekci potvrdila ještě významnější rozdíl SN arey mezi skupinami ($p < 0,0001$; viz Tabulku 8).



Obr.41 – Porovnání echogenní arey substantia nigra ve studijních skupinách (modrá: kontroly; červená: idiopatická forma poruchy chování ve spánku [iRBD]; tmavě zelené obdélníky: Parkinsonova nemoc s RBD (PD+RBD); světle zelené kruhy: Parkinsonova nemoc bez RBD (noRBD))

Kvůli posouzení vlivu RBD na echogenitu SN byla skupina s PN rozdělena na dvě podskupiny (PD-noRBD a PD+RBD), které byly dále analyzovány odděleně. RBD příznaky byly diagnostikovány u 25 % (n=11) pacientů s PD+RBD. Jejich velikost SN arey se od skupiny PD-noRBD nelišila (p=0.15; viz Tabulku 9).

Tabulka 9 – Echogenita SN area a DAT-SPECT specifické vazebné poměry u podskupin iRBD a PN

	iRBD	PN bez RBD (PD-noRBD)	PN s RBD (PD+RBD)	p-hodnota
Počet pacientů (ženy)	61 (4)	33 (12)	11 (1)	<0,0005*
SN area (cm²); medián ± mezikvartilový rozptyl (více postižená hemisféra)	0,07 ± 0,08	0,30 ± 0,14	0,22 ± 0,02	<0,001**
SBR putamen (více postižená hemisféra)	2,9 ± 0,7	1,6 ± 0,3	1,2 ± 0,3	<0,0001***
SBR nucleus caudatus (více postižená hemisféra)	3,8 ± 0,8	3,3 ± 0,6	2,6 ± 0,7	<0,0004****
* Oboustranný Fisherův test poměru mužů a žen signifikantní pro iRBD vs PD-noRBD				
** Jednorozměrná ANOVA, HSD post-hoc test signifikantní pro iRBD vs PD-noRBD (p<0,002); a pro iRBD vs. PD+RBD (p<0,001)				
*** Jednorozměrná ANOVA, HSD post-hoc test signifikantní pro iRBD vs PD-noRBD (p<0,0001); a pro iRBD vs PD+RBD (p<0,0001)				
**** Jednorozměrná ANOVA, HSD post-hoc test signifikantní pro iRBD vs. PD + RBD; RBD vs. PD-noRBD; PD+RBD vs. PD-noRBD (p <0,0004)				

PN – Parkinsonova nemoc; RBD – REM behavior disorder (porucha chování v REM spánku); SN – SN; SBR – specifické vazebné poměry (specifický vazebný poměr)

Korelace TCS, DAT-SPECT a klinického nálezu

Pro potřeby studie byla použita vyšší hodnota SN arey z bilaterálního sonografického vyšetření, která byla porovnávána s ipsilaterálním (korespondujícím) putaminálním SBR (viz Obr.40). Následná kontingenční analýza neprokázala signifikantní rozdíl v zastoupení patologického nálezu na DAT-SPECT mezi iRBD pacienty s normálním a abnormálním TCS nálezem (21,2 % vs. 35,7 %; p=0,28).

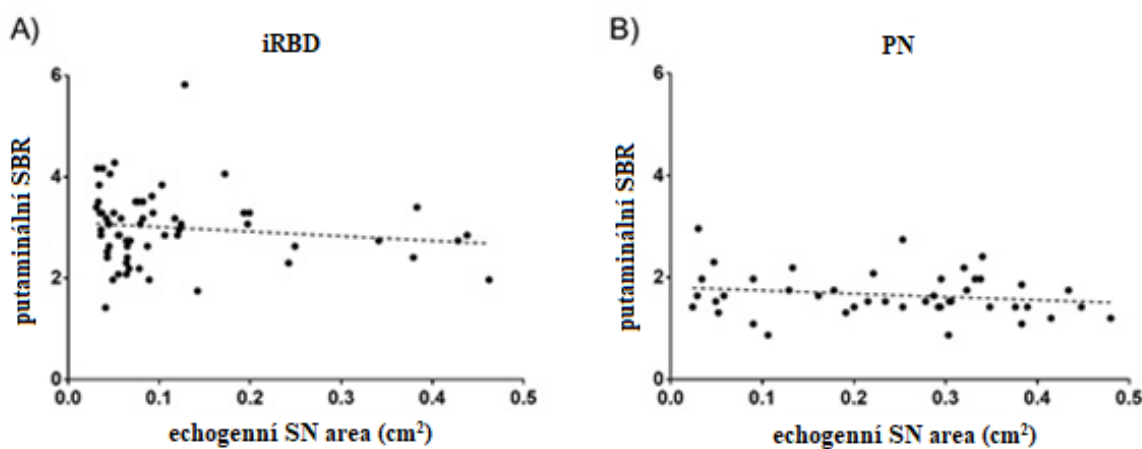
Kvantitativní srovnání pacientů s normálním a abnormálním TCS nálezem, po korekci na věk a pohlaví, neukázalo rozdílné hodnoty putaminálního SBR odpovídajícího stranově vyšší SN aree ani ve skupině iRBD (p=0,45) ani u pacientů s PN (p=0,80). Analýza SBR caudata přinesla stejné výsledky (p = 0,63 u iRBD a p = 0,84 ve skupině PN; podrobné výsledky v Tabulce 10).

Tabulka 10 – Klinické a zobrazovací nálezy u pacientů s PN a podskupin iRBD dle výsledků TCS

	iRBD/ normální TCS nález	iRBD/ abnormální TCS nález	p- value	PN/ normální TCS nález	PN/ abnormální TCS nález	p-value
Počet subjektů (ženy)	47 (4)	14 (0)	0,56	11 (4)	33 (9)	0,71
Průměrný věk ± SO (roky)	65,7± 8,4	68,5 ± 6,1	0,89	57,0 ± 13,9	56,0 ± 11,6	1,00
Průměrné trvání subjektivních příznaků ± SO (roky)	9,0 ± 9,5	4,8 ± 4,2	0,36	2,2 ± 6,4	2,2 ± 1,6	1,00
Průměrný stranově odpovídající putaminální specifický vazebný poměr ± SO	3,00 ± 0,63	3,02 ± 0,97	1,00	1,70 ± 0,58	1,65 ± 0,39	1,00
Průměrný stranově odpovídající kaudátový specifický vazebný poměr ± SO	3,76 ± 0,74	3,55 ± 0,49	0,63	3,15 ± 0,83	3,09 ± 0,60	0,84
Průměrné MDS- UPDRS-III subsóre ± SO	5,6 ± 5,49	8,6 ± 5,05	0,84	32,3 ± 14,26	27,2 ± 12,2	0,59

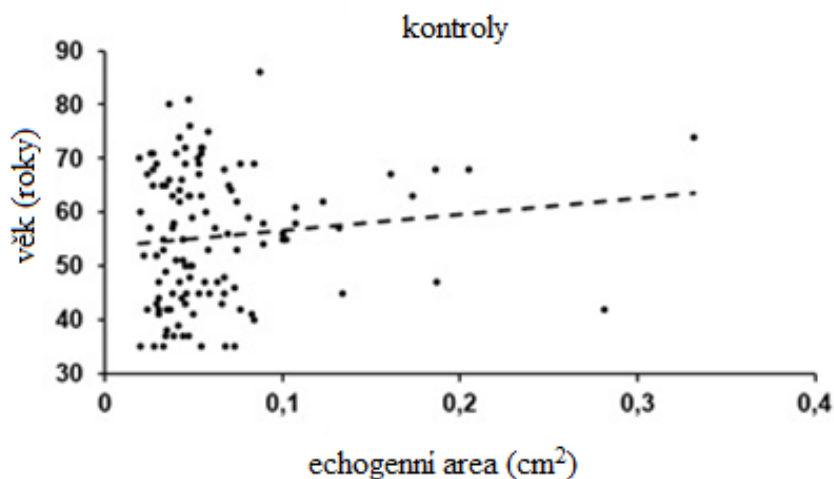
iRBD – idiopatická forma poruchy chování v REM spánku; MDS-UPDRS-III – Movement Disorder Society-Unified Parkinson's Disease Rating Scale. motorické subsóre; PN – Parkinsonova nemoc; SN – SN; SO – směrodatná odchylka. TCS – transkraniální sonografie

Parciální korelační analýza korigovaná na věk a pohlaví neprokázala korelaci větší SN arey a odpovídajícího putaminálního SBR ani u iRBD ($r = -0,13$, $p = 0,29$), ani ve skupině PN ($r = -0,19$, $p = 0,22$; viz Obr.42).



Obr.42 – Grafy korelace mezi putaminálními striatálními vazebnými poměry (striatal binding ratio) a echogenitou substantia nigra ve skupině A) idiopatická forma poruchy chování ve spánku (iRBD); B) Parkinsonova nemoc

U pacientů s PN nebyl prokázán rozdíl v zastoupení pohlaví, ani ve věku začátku klinických příznaků mezi podskupinou s normálním a abnormálním TCS nálezem ($54,1 \pm 15,2$; $54,2 \pm 12,0$ let; $p=0,71$). Echogenita SN arey nekorelovala s věkem ani v jedné ze zkoumaných skupin ($r=0,17$; $p=0,18$ u iRBD; $r=0,11$; $p=0,49$ u PN; $r=0,10$; $p=0,28$ u kontrol).



Obr.43 - Distribuce arey substantia nigra podle věku u zdravých kontrol

Další zkoumanou oblastí byl vliv nálezu na TCS a SPECT na motorické funkce. Pacienti s iRBD, kteří měli normální nález v obou vyšetřeních měli signifikantně nižší motorické subskóre MDS-UPDRS III ($4,9 \pm 3,9$) v porovnání s těmi, u kterých byl alespoň na jednom zobrazení zachycen abnormální nález ($8,8 \pm 6,9$; $p=0,03$; viz Tabulku 11). Podrobnější korelační analýza zohledňující věk a pohlaví prokázala asociaci mezi MDS-UPDRS-III a SN areou u pacientů s iRBD ($r=0,27$; $p=0,045$) a mezi MDS-UPDRS-III a putaminálním SBR u PN ($r=-0,37$; $p=0,005$).

Tabulka 11 – Poměr pacientů idiopatickou formou poruchy chování v REM spánku (iRBD) s normálním/abnormálním nálezem na transkraniální sonografii a DAT-SPECT

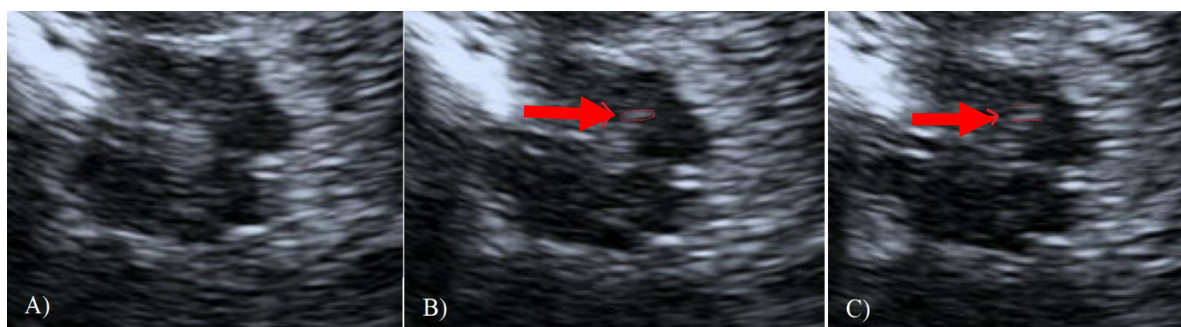
		abnormální SN area	normální SN area
abnormální putaminální SBR	počet pacientů; n	5	10
	MDS-UPDRS III subskóre; průměr \pm SO	$6,4 \pm 3,6$	$9,0 \pm 9,0$
normální putaminální SBR	počet pacientů; n	9	37
	MDS-UPDRS III subskóre; průměr \pm SO	$9,9 \pm 5,8$	$4,9 \pm 3,9$

SN – SN; SBR – striatal binding ratio (striatální vazebný poměr); SO – směrodatná odchylka; MDS-UPDRS-III – Movement Disorder Society. Unified Parkinson's Disease Rating Scale, motorická část

4.3.4 Diskuze

Ačkoliv výsledky naší studie potvrdily, že je průměrná hodnota echogenní arey SN u pacientů s iRBD vyšší než v kontrolní skupině, hodnoty překračující námi stanovený cut off byly přítomny pouze u menšiny iRBD subjektů.

Medián SN arey se mezi jednotlivými studovanými skupinami lišil (PN > iRBD > kontroly; viz Obr.41) a zastoupení abnormálních TCS nálezů bylo u iRBD signifikantně vyšší v porovnání se zdravými kontrolami. Cut off stanovený v naší studii (**0,126cm²**) byl nižší než obvykle publikovaná hodnota 0,20cm². Důvodů odlišných hodnot může být několik: prvním z nich je přebírání dříve publikované hodnoty místo výpočtu vlastní (viz Tabulku 12); druhým může být dodatečná manuální úprava parametrů (zejména zesílení signálu změnou gainu) u pacientů s hůře prostupnými kostními okny, které mohou vést k nadhodnocení plochy oblasti SN; a konečně třetím odlišné techniky manuálního označování oblasti SN mezi jednotlivými studii. Hyperechogenní struktury v okolí SN (například nucleus ruber, cévních struktury a perimezencefalické cisterny), mohou vést k chybnému ohraničení SN arey (viz Obr.44).



Obr.44 – Tři navazující řezy na transkraniální sonografii: A) thalamus; B) substantia nigra oválného tvaru v mezencefalickém řezu; C) dvojité linie v oblasti mezencefala, nejspíše na podkladě probíhající cévy

Námi použitý cut off byl stanoven zhodnocením výsledků dvou na sobě nezávislých hodnotitelů s vysokou **inter-rater shodou** a jeho specifita i senzitivita odpovídají dosud publikovaným TCS studiím (viz Obr.39). Sonografické vyšetření všech pacientů proběhlo ve zcela totožném nastavení, bez ohledu na prostupnost kostních oken

Abnormální TCS nález byl v naší studii zjištěn pouze u 23 % iRBD pacientů, ačkoliv dříve publikované studie udávají záchyt zvýšené echogenity SN arey mezi 32-63 %. Procentuální zastoupení se výrazně lišila dle počtu iRBD pacientů ve studiích i doby jejich sledování, proto jsme pro porovnání zprůměrnili výsledky ze všech u iRBD dosud provedených TCS studií (viz Tabulku 12). Výsledná hodnota, 44 % iRBD pacientů s abnormální SN echogenitou, téměř dvojnásobně převyšuje námi udávanou hodnotu.

Důvod výrazného rozdílu hodnot může být stanovení naší cut off hodnoty jako optimální pro odlišení pacientů s PN od zdravých kontrol na základě ROC analýzy. Pokud bychom stanovili cut off

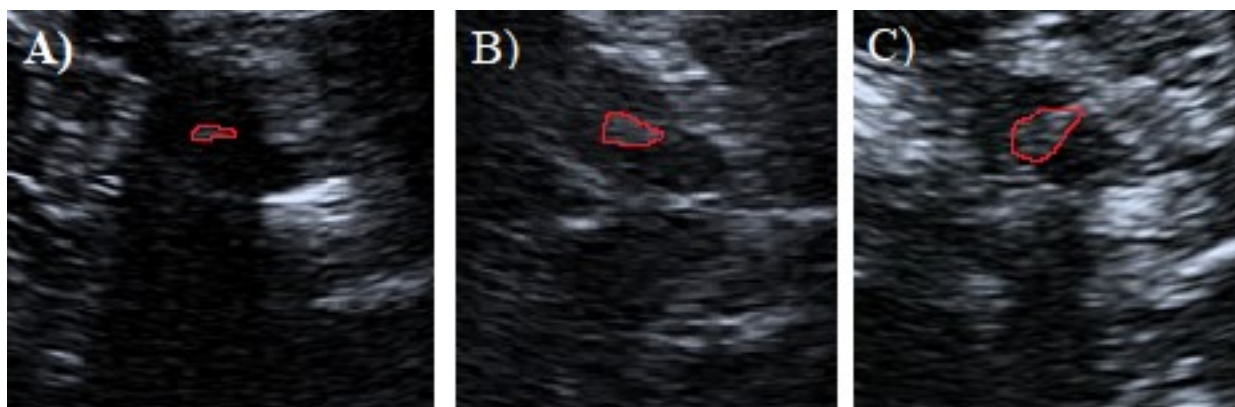
jako 90. percentil SN arey v kohortě zdravých subjektů, došlo by ke snížení jeho hodnoty na 0,1 cm² a abnormální nález by pak byl u 32 % iRBD pacientů. Dalším faktorem ovlivňující mezní hodnotu SN arey mohlo být odlišné nastavení ultrazvukového přístroje či metodika výběru iRBD pacientů.

Tabulka 12 – Mezní hodnoty (cut off) u pacientů s iRBD v předchozích publikovaných studiích

První autor rok publikace	Cut off (cm ²)	iRBD SN area (cm ²)	PN SN area (cm ²)	Kontroly SN area (cm ²)	Počet iRBD (abnormální TCS v %)	Ultrazvukový přístroj
(Iwanami, Miyamoto et al. 2010)	0,20 (převzatý cut off)	0,20 ± 0,13	0,22 ± 0,11	0,06 ± 0,06	34 (41,2)	Logic 7. GE
(Stockner, Iranzo et al. 2009)	0,20 (90. percentil)	0,20 ± 0,09	N.D.	0,14 ± 0,05	51 (37,3)	Logic 7. GE
(Iranzo, Lomena et al. 2010)	0,20 (90. percentil)	0,20 ± 0,09	N.D.	0,14 ± 0,05	39 (36,0)	Logic 7. GE
(Shin, Joo et al. 2013)	0,20 (převzatý cut off)	0,29 ± 0,47	0,72 ± 0,41	0,11 ± 0,17	12 (50,0)	Philips
(Vilas, Iranzo et al. 2015)	0,20 (převzatý cut off)	0,24 ± 0,10	N.D.	0,176 ± 0,11	59 (62,7)	Phillips
(Miyamoto and Miyamoto 2013)	0,18 (převzatý cut off)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
(Iranzo, Stockner et al. 2014)	0,20 (převzatý cut off)	0,20 ± 0,09	N.D.	N.D.	31 (32,3)	Logic 7. GE
(Noyce, Dickson et al. 2018)	0,16 (převzatý cut off)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	GE Healthcare

REM – Rapid Eye Movement; SN – SN; iRBD – idiopatická forma poruchy chování v REM spánku; N.D. – není dostupné

Naše studie byla zaměřena také na porovnání TCS nálezů zohledňující přítomnosti či absenci RBD příznaků u pacientů s PN. Předchozí studie zkoumaly u těchto podskupin pouze odlišnosti v klinickému nálezu a na DaTscanu. Pacienti s prodromální (iRBD) a manifestní (PD+RBD) synukleinopatií se svými nálezy v TCS a DAT-SPECT významně lišili, v neprospěch skupiny PD+RBD. U pacientů s PN se echogenita SN mezi podskupinami PD+RBD a PD-noRBD nelišila.



Obr.45 – Nález zachycené u pacientů s pacientů s idiopatickou formou poruchy chování v REM spánku (iRBD):
 A) normální echogenita substantia nigra (SN); B) hraniční echogenita SN; C) zvýšená hyperechogenita SN

Dle **semikvantitativního pozorování** bylo možné sonografické nálezy u iRBD rozdělit do tří skupin: normální SN area (nález obvykle pozorovaný u zdravých kontrol), zvýšená echogenita SN nepřesahující cut off hodnotu a abnormální SN echogenita (viz Obr.45). Porovnání klinického postižení neprokázalo mezi jednotlivými skupinami signifikantní rozdíly (viz Tabulku 13).

Tabulka.13 – Korelace velikosti echogenity SN u RBD pacientů s provedenými klinickými testy

	normální nález ($<0,1\text{cm}^2$)	hraniční nález ($<0,1-0,2\text{cm}^2$)	abnormální nález ($>0,2\text{cm}^2$)
Věk; průměr \pm SO	67,8 \pm 8,1	68,91 \pm 5,2	69,29 \pm 5,95
Trvání příznaků (roky)	9,95	8,0	5,45
MDS-UPDRS III	5,23	6,0	7,0
MoCA; průměr \pm SO	24,56	22,55	22,67
UPSIT; průměr \pm SO	23,51	18,57	21,0
Feritin	182,29	303,57	125,55
Sérové železo	21,17	20,86	19,85
Obstipace (%)	23,26	10	28,57
Ortostáza (%)	30,24	20	42,86
SCOPA-AUT	11,12	10,55	9,17

SO – směrodatná odchylka; MDS-UPDRS III – Movement Disorder Society-UPDRS-III – Unified Parkinson's Disease Rating Scale, část III; MoCA – Montreal Cognitive Assessment; UPSIT – University of Pennsylvania smell identification test; SCOPA-AUT – Autonomic Scale for Outcomes in Parkinson's Disease

Skutečnost, že většina iRBD pacientů s odstupem času konvertuje do MSA, DLB a PN (často s přidruženou demencí), naznačuje, že tyto poruchy mohou představovat odlišné fenotypy vycházející ze stejného fragilního terénu.(Iranzo, Fernandez-Arcos et al. 2014) Toto tvrzení podporuje výskyt abnormální echogenity SN arey nejen u PN, ale i u atypických parkinsonských syndromů. Zejména pacienti s DLB, často trpící RBD příznaky, mívají na TCS nález výrazné bilaterální hyperechogenity SN. Tento výsledek byl potvrzen i vyšetření několika DLB subjektů na našem pracovišti.

Na druhé straně, role normální SN arey u pacientů s iRBD ve **fenokonverzi** do synukleinopatií, nebyla dosud uspokojivě objasněna. Naše pozorování ukazují, že normální SN area bývá běžným nálezem u pacientů s iRBD, u kterých dochází k rozvoji parkinsonismu až s velkým časovým odstupem. Dříve publikovanými studii zmiňovaná asociace mezi normální SN areou a pozdním nástupem příznaků u PN se však v naší studii nepotvrdila.

Naše výsledky dále potvrdily, že echogenita SN není ani v jedné ze zkoumaných skupin asociována se sníženou hustotou dopaminergních transportérů. To potvrzuje i skutečnost, že u některých subjektů se abnormální nálezy na TCS a na DAT-SPECT stranově neshodovaly. Tyto závěry se shodují s dosud publikovanými studii.

U pacientů s iRBD a normálním nálezem na TCS i DAT-SPECT jsme pozorovali signifikantně menší motorický deficit než u subjektů s abnormálním nálezem pouze na jedné ze zmiňovaných metod. To naznačuje, že patologie v obou typech vyšetření má vlastní funkční následek a že patologie v libovolném z nich (jak v DAT-SPECT tak v TCS) představuje rizikový faktor pro fenokonverzi.

Je možné, že hyperechogenní SN odráží pouze **zranitelnost** dané oblasti pro případné ukládání abnormálního α S. Abnormalita TCS by tak mohla představovat rizikový faktor pro výskyt motorických příznaků s méně závažnou degenerací dopaminergních neuronů na DAT-SPECT. Analogicky k tomuto tvrzení mohou být dopaminergní neurony u pacientů s normálním TCS nálezem méně citlivé na přítomnost depozit α S a u těchto pacientů může docházet k manifestaci příznaků z postižení odlišných jader před samotným nástupem parkinsonismu. Tyto teorie však vyžadují ověření dlouhodobým pozorováním většího počtu iRBD subjektů.

Asociace mezi abnormálním nálezem TCS a horším motorickým subscore MDS-UPDRS III, dříve popisovaná ve starší populaci, byla v naší studii u pacientů s iRBD potvrzena pouze částečně. Korelace mezi SN areou a MDS-UPDRS III nebyla signifikantní. Statistického významu dosáhla pouze při současném zohlednění putaminálního SBR. Toto zjištění je plně v souladu s předpokladem, že hyperechogenita SN sama o sobě není přímým nositelem motorického deficitu. Významu nabývá při současně probíhajícím neurodegenerativním procesu, kdy se stává zranitelným terénem vedoucím k akcentaci nigrostriálního deficitu.

V rámci vyloučení strukturálních lézí byla u všech subjektů provedena **MR mozku**. V dosud publikovaných studiích byly nálezy z konvenční MR u pacientů s iRBD nespécifické a jejich závěry se rozcházely.(Culebras and Moore 1989, Shirakawa, Takeuchi et al. 2002, Eisensehr, Linke et al. 2003, Mazza, Soucy et al. 2006, Scherfler, Frauscher et al. 2011, Lee, Han et al. 2014, Rahayel, Montplaisir et al. 2015) Je zajímavé, že opakovaně zachycenou patologií u některých iRBD byl redukovaný objem putamen,(Ellmore, Hood et al. 2010) což je nález obvykle pozorovaný u MSA.(Schulz, Skalej et al. 1999, Brooks, Seppi et al. 2009, Seppi and Poewe 2010, Sako, Murakami et al. 2014) I přes zvažovanou možnost, že se v těchto případech jedná o pacienty s MSA před fenokonverzí a klinickou

manifestací, procentuální zastoupení abnormálního MR zobrazení a incidence MSA neodpovídaly.(Heller, Brcina et al. 2017)

Ačkoliv je iRBD uznáváno jako prodromální fáze synukleinopatií, studie zkoumající u této diagnózy **depozita železa** nebo jiných kovů jsou velmi ojedinělé. Na R2* snímcích 3T MR nebyla v minulosti potvrzena kumulace železa, která by odlišovala pacienty s iRBD od zdravých osob.(Lee, Han et al. 2014) Ve studii kombinující DTI (*diffusion tensor imaging*), neuromelanin senzitivní mapování a na železo citlivé R2*(Pyatigorskaya, Gaurav et al. 2017) byla u iRBD pacientů v porovnání s kontrolní skupinou prokázána pouze redukce neuromelaninu(Garcia-Lorenzo, Longo-Dos Santos et al. 2013, Sommerauer, Fedorova et al. 2018) a snížená frakční anizotropie. Ta se lišila mezi jednotlivými oblastmi mozku (Unger, Belke et al. 2010, Scherfler, Frauscher et al. 2011) a mohla by odrážet mikrostrukturální tkáňové změny v této oblasti.(Boeve 2010, Fraigne, Torontali et al. 2015)

Na námi doplněných snímcích MR nebyla v místě SN, dle předběžného zhodnocení, pozorována zjevná akumulace železa. Vedlejším nálezem byla u některých pacientů v oblasti mezencefala přítomná zvýšená **vaskularizace** (viz Obr.44). Na základě pilotních dat však nebylo možné zhodnotit, zda se jedná o novotvořené cévy nebo pouze o rozšíření perivaskulárních prostorů. Při sonografickém vyšetření nejsou tyto cévní abnormality na dopplerovském zobrazení zachytitelné. Získané poznatky z MR jsou zatím ve fázi zpracování, vyžadují další podrobnější analýzu a opakování zobrazení k posouzení vývoje ložiskových změn v čase.

Hlavními **nedostatky naší studie** byl průřezový design, absence vyšetření DAT-SPECT a MDS-UPDRS III skóre u zdravých jedinců a relativně malý počet pacientů s PD+RBD. Dalším omezením byl lehce vyšší věk a převaha mužů ve skupině iRBD.

Výsledky studie potvrdily odlišné hodnoty echogenity SN arey mezi jednotlivými zkoumanými skupinami (PN, iRBD, kontroly). Pacienti s iRBD měli v porovnání s předchozími výsledky relativně nízkou prevalenci abnormálního TCS nálezu. Specifický fenotyp synukleinopatie pak nejspíše představují iRBD pacienti s mnohaletou spánkovou symptomatikou předcházející manifestní neurologický deficit. Echogenita SN arey u pacientů s PN a příznaky RBD byla srovnatelná s těmi bez RBD. Normální nálezy na TCS a DAT-SPECT u pacientů s iRBD jsou spojeny s normální motorickou funkcí.

Na základě našich pozorování jsme dospěli k závěru, že SN hyperechogenita odráží strukturální a DaTscan funkční změny v dopaminergní transmissi. Vyšetření TCS a DAT-SPECT se tedy navzájem doplňují, ale nenahrazují se.

5 Závěry

- A) Indexy echogenity substantia nigra a nucleus lentiformis stanovené digitální analýzou snímků získaných pomocí fúze transkraniální sonografie s MR, potvrdily, že sonografické nálezy u pacientů s Wilsonovou a Parkinsonovou nemocí jsou charakteristické a vyznačují se vysokou specificitou a senzitivitou. Lze je použít jako screeningový nástroj v diagnostického procesu zejména u pacientů s atypickým průběhem parkinsonského syndromu. Jako spolehlivý marker sledování efektu chelatační terapie nebo prognózy onemocnění se echogenita, pro nezávislost na klinické závažnosti, délce trvání a léčby, neosvědčila.
- B) Hyperechogenita inzuly zobrazitelná transkraniální sonografií se, stejně jako hyperechogenita nucleus lentiformis, potvrdila jako další specifický nález pozorovaný u Wilsonovy nemoci. Mezi echogenitou obou struktur byla navíc pozorována silná pozitivní korelace, nasvědčující společnou patogenezi signálových změn. T2 hypointenzity nucleus lentiformis odpovídající depozitům železa s echogenitou nekorelovaly, vliv mědi nebylo možné ověřit.
- C) Výsledky naší práce potvrdily zvýšení echogenity substantia nigra u pacientů s idiopatickou formou poruchy chování v REM spánku, ale v rozporu s předchozími studii, byl abnormální nález (přesahující stanovený cut off) zjištěn pouze u menšiny pacientů. Při porovnání výsledků echogenity substantia nigra a DAT-SPECT byly výsledky více alterovány u pacientů s Parkinsonovou nemocí s projevy RBD než u skupiny idiopatické RBD. Echogenita arey substantia nigra se mezi pacienty s Parkinsonovou nemocí s projevy RBD a bez RBD nelišila.

6 Seznam zkratek

α S	alfa-synuklein
A β	beta-amyloid
AN	Alzheimerova nemoc
BG	bazální ganglia
DaTscan	dopamine transporter scan
DMT1	divalent metal transporter 1 (transportér dvojmocných kovů 1)
EO-PN	early onset – Parkinsonova nemoc (Parkinsonova nemoc s časným počátkem)
KO	kontroly
MBq	megabecquerel
MR	magnetická rezonance
MSA	multisystémová atrofie
PN	Parkinsonova nemoc
PSP	progresivní supranukleární obrna (progressive supranuclear palsy)
RBD	rapid eye movement behaviour disorder (porucha chování v REM spánku)
TCS	transkraniální sonografie
SBR	specific binding ratio (specifický vazebný poměr)
SO	směrodatná odchylka
SN	substantia nigra
SPECT	single photon emission computed tomography
UPDRS	Unified Parkinson's rating scale (Jednotná škála hodnocení PN)
UWDRS	Unified Wilson's rating scale (Jednotná škála hodnocení WN)
WN	Wilsonova nemoc

7 Literatura

- Abbaspour, N., R. Hurrell and R. Kelishadi (2014). "Review on iron and its importance for human health." *J Res Med Sci* **19**(2): 164-174.
- Amm, I., T. Sommer and D. H. Wolf (2014). "Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system." *Biochim Biophys Acta* **1843**(1): 182-196.
- Aquino, D., A. Bizzi, M. Grisoli, B. Garavaglia, M. G. Bruzzone, N. Nardocci, M. Savoardo and L. Chiapparini (2009). "Age-related iron deposition in the basal ganglia: quantitative analysis in healthy subjects." *Radiology* **252**(1): 165-172.
- Armstrong, M. J., I. Litvan, A. E. Lang, T. H. Bak, K. P. Bhatia, B. Borroni, A. L. Boxer, D. W. Dickson, M. Grossman, M. Hallett, K. A. Josephs, A. Kertesz, S. E. Lee, B. L. Miller, S. G. Reich, D. E. Riley, E. Tolosa, A. I. Troster, M. Vidailhet and W. J. Weiner (2013). "Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration." *Neurology* **80**(5): 496-503.
- Armstrong, M. J. and M. S. Okun (2020). "Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review." *JAMA* **323**(6): 548-560.
- Armstrong, R. A. (1995). "Beta-amyloid deposition in the medial temporal lobe in elderly non-demented brains and in Alzheimer's disease." *Dementia* **6**(3): 121-125.
- Arredondo, M., R. Martinez, M. T. Nunez, M. Ruz and M. Olivares (2006). "Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc." *Biol Res* **39**(1): 95-102.
- Ashraf, A., C. Michaelides, T. A. Walker, A. Ekonomou, M. Suessmilch, A. Sriskanthanathan, S. Abraha, A. Parkes, H. G. Parkes, K. Geraki and P. W. So (2019). "Regional Distributions of Iron, Copper and Zinc and Their Relationships With Glia in a Normal Aging Mouse Model." *Front Aging Neurosci* **11**: 351.
- Aschner, M., K. M. Erikson, E. Herrero Hernandez and R. Tjalkens (2009). "Manganese and its role in Parkinson's disease: from transport to neuropathology." *Neuromolecular Med* **11**(4): 252-266.
- Attieh, Z. K., C. K. Mukhopadhyay, V. Seshadri, N. A. Tripoulas and P. L. Fox (1999). "Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism." *J Biol Chem* **274**(2): 1116-1123.
- Ballatori, N., S. M. Krance, S. Notenboom, S. Shi, K. Tieu and C. L. Hammond (2009). "Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases." *Biol Chem* **390**(3): 191-214.
- Banoei, M. M., M. Houshmand, M. S. Panahi, P. Shariati, M. Rostami, M. D. Manshadi and T. Majidzadeh (2007). "Huntington's disease and mitochondrial DNA deletions: event or regular mechanism for mutant huntingtin protein and CAG repeats expansion?!" *Cell Mol Neurobiol* **27**(7): 867-875.
- Baranovicova, E., E. Kantorova, D. Kalenska, L. Lichardusova, M. Bittsan-Sky and D. Dobrota (2017). "Thalamic paramagnetic iron by T2* relaxometry correlates with severity of multiple sclerosis." *J Biomed Res* **31**(4): 301-305.
- Barker, R. A. and C. H. Williams-Gray (2016). "Review: The spectrum of clinical features seen with alpha synuclein pathology." *Neuropathol Appl Neurobiol* **42**(1): 6-19.
- Barthel, H., W. Hermann, R. Kluge, S. Hesse, D. R. Collingridge, A. Wagner and O. Sabri (2003). "Concordant pre- and postsynaptic deficits of dopaminergic neurotransmission in neurologic Wilson disease." *AJNR Am J Neuroradiol* **24**(2): 234-238.
- Bartova, P., D. Skoloudik, M. Bar, P. Ressler, P. Hlustik, R. Herzig and P. Kanovsky (2008). "Transcranial sonography in movement disorders." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **152**(2): 251-258.
- Bartzokis, G., M. Beckson, D. B. Hance, P. Marx, J. A. Foster and S. R. Marder (1997). "MR evaluation of age-related increase of brain iron in young adult and older normal males." *Magn Reson Imaging* **15**(1): 29-35.
- Bartzokis, G., M. Beckson and W. Ling (1996). "Clinical and MRI evaluation of psychostimulant neurotoxicity." *NIDA Res Monogr* **163**: 300-317.
- Bartzokis, G., J. Cummings, S. Perlman, D. B. Hance and J. Mintz (1999). "Increased basal ganglia iron levels in Huntington disease." *Arch Neurol* **56**(5): 569-574.
- Bartzokis, G., J. L. Cummings, C. H. Markham, P. Z. Marmarelis, L. J. Treciokas, T. A. Tishler, S. R. Marder and J. Mintz (1999). "MRI evaluation of brain iron in earlier- and later-onset Parkinson's disease and normal subjects." *Magn Reson Imaging* **17**(2): 213-222.
- Bartzokis, G. and S. R. Marder (1995). "Magnetic resonance imaging evaluation of brain iron levels." *Biol Psychiatry* **38**(2): 133-135.
- Bartzokis, G., J. Mintz, D. Sultzer, P. Marx, J. S. Herzberg, C. K. Phelan and S. R. Marder (1994). "In vivo MR evaluation of age-related increases in brain iron." *AJNR Am J Neuroradiol* **15**(6): 1129-1138.
- Bartzokis, G., D. Sultzer, J. Cummings, L. E. Holt, D. B. Hance, V. W. Henderson and J. Mintz (2000). "In vivo evaluation of brain iron in Alzheimer disease using magnetic resonance imaging." *Arch Gen Psychiatry* **57**(1): 47-53.
- Bartzokis, G., D. Sultzer, J. Mintz, L. E. Holt, P. Marx, C. K. Phelan and S. R. Marder (1994). "In vivo evaluation of brain iron in Alzheimer's disease and normal subjects using MRI." *Biol Psychiatry* **35**(7): 480-487.
- Bartzokis, G. and T. A. Tishler (2000). "MRI evaluation of basal ganglia ferritin iron and neurotoxicity in Alzheimer's and Huntington's disease." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **46**(4): 821-833.

Bartzokis, G., T. A. Tishler, P. H. Lu, P. Villablanca, L. L. Altschuler, M. Carter, D. Huang, N. Edwards and J. Mintz (2007). "Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration." *Neurobiol Aging* **28**(3): 414-423.

Batla, A. and C. Gaddipati (2019). "Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation." *Ann Indian Acad Neurol* **22**(3): 267-276.

Becker, G., T. Becker, M. Struck, A. Lindner, K. Burzer, W. Retz, U. Bogdahn and H. Beckmann (1995). "Reduced echogenicity of brainstem raphe specific to unipolar depression: a transcranial color-coded real-time sonography study." *Biol Psychiatry* **38**(3): 180-184.

Becker, G., D. Berg, M. Francis and M. Naumann (2001). "Evidence for disturbances of copper metabolism in dystonia: from the image towards a new concept." *Neurology* **57**(12): 2290-2294.

Becker, G., D. Berg, K. P. Lesch and T. Becker (2001). "Basal limbic system alteration in major depression: a hypothesis supported by transcranial sonography and MRI findings." *Int J Neuropsychopharmacol* **4**(1): 21-31.

Becker, G., D. Berg, W. D. Rausch, H. K. Lange, P. Riederer and K. Reiners (1999). "Increased tissue copper and manganese content in the lentiform nucleus in primary adult-onset dystonia." *Ann Neurol* **46**(2): 260-263.

Becker, J. S., M. V. Zoriy, C. Pickhardt, N. Palomero-Gallagher and K. Zilles (2005). "Imaging of copper, zinc, and other elements in thin section of human brain samples (hippocampus) by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry." *Anal Chem* **77**(10): 3208-3216.

Becker, T., G. Becker, J. Seufert, E. Hofmann, K. W. Lange, M. Naumann, A. Lindner, H. Reichmann, P. Riederer, H. Beckmann and K. Reiners (1997). "Parkinson's disease and depression: evidence for an alteration of the basal limbic system detected by transcranial sonography." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **63**(5): 590-596.

Behnke, S., D. Berg and G. Becker (2003). "Does ultrasound disclose a vulnerability factor for Parkinson's disease?" *J Neurol* **250** Suppl 1: I24-27.

Behnke, S., D. Berg, M. Naumann and G. Becker (2005). "Differentiation of Parkinson's disease and atypical parkinsonian syndromes by transcranial ultrasound." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **76**(3): 423-425.

Bennett, J. and S. H. Hahn (2011). "Clinical molecular diagnosis of Wilson disease." *Semin Liver Dis* **31**(3): 233-238.

Berg, D. (2006). "Transcranial sonography in the early and differential diagnosis of Parkinson's disease." *J Neural Transm Suppl*(70): 249-254.

Berg, D., G. Becker, B. Zeiler, O. Tucha, E. Hofmann, M. Preier, P. Benz, W. Jost, K. Reiners and K. W. Lange (1999). "Vulnerability of the nigrostriatal system as detected by transcranial ultrasound." *Neurology* **53**(5): 1026-1031.

Berg, D., S. Behnke, K. Seppi, J. Godau, S. Lerche, P. Mahlknecht, I. Liepelt-Scarfone, C. Pausch, N. Schneider, A. Gaenslen, K. Brockmann, K. Srulijes, H. Huber, I. Wurster, H. Stockner, S. Kiechl, J. Willeit, A. Gasperi, K. Fassbender, T. Gasser and W. Poewe (2013). "Enlarged hyperechogenic substantia nigra as a risk marker for Parkinson's disease." *Mov Disord* **28**(2): 216-219.

Berg, D., S. Behnke and U. Walter (2006). "Application of transcranial sonography in extrapyramidal disorders: updated recommendations." *Ultraschall Med* **27**(1): 12-19.

Berg, D., M. Gerlach, M. B. Youdim, K. L. Double, L. Zecca, P. Riederer and G. Becker (2001). "Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease." *J Neurochem* **79**(2): 225-236.

Berg, D., J. Godau, P. Riederer, M. Gerlach and T. Arzberger (2010). "Microglia activation is related to substantia nigra echogenicity." *J Neural Transm (Vienna)* **117**(11): 1287-1292.

Berg, D., J. Godau and U. Walter (2008). "Transcranial sonography in movement disorders." *Lancet Neurol* **7**(11): 1044-1055.

Berg, D., C. Grote, W. D. Rausch, M. Maurer, W. Wesemann, P. Riederer and G. Becker (1999). "Iron accumulation in the substantia nigra in rats visualized by ultrasound." *Ultrasound Med Biol* **25**(6): 901-904.

Berg, D. and H. Hochstrasser (2006). "Iron metabolism in Parkinsonian syndromes." *Mov Disord* **21**(9): 1299-1310.

Berg, D., B. Merz, K. Reiners, M. Naumann and G. Becker (2005). "Five-year follow-up study of hyperechogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease." *Mov Disord* **20**(3): 383-385.

Berg, D., W. Roggendorf, U. Schroder, R. Klein, T. Tatschner, P. Benz, O. Tucha, M. Preier, K. W. Lange, K. Reiners, M. Gerlach and G. Becker (2002). "Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury." *Arch Neurol* **59**(6): 999-1005.

Berg, D., K. Seppi, I. Liepelt, K. Schweitzer, F. Wollenweber, B. Wolf, U. Dillmann, H. Stockner, J. Godau, S. Kiechl, A. Gaenslen, J. Willeit, A. Di Santo, W. Maetzler, T. Gasser, W. Poewe and S. Behnke (2010). "Enlarged hyperechogenic substantia nigra is related to motor performance and olfaction in the elderly." *Mov Disord* **25**(10): 1464-1469.

Berg, D., C. Siefker and G. Becker (2001). "Echogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease and its relation to clinical findings." *J Neurol* **248**(8): 684-689.

Berg, D., C. Siefker, P. Ruprecht-Dorfler and G. Becker (2001). "Relationship of substantia nigra echogenicity and motor function in elderly subjects." *Neurology* **56**(1): 13-17.

Bertinet, D. B., M. Tinivella, F. A. Balzola, A. de Francesco, O. Davini, L. Rizzo, P. Massarenti, M. A. Leonardi and F. Balzola (2000). "Brain manganese deposition and blood levels in patients undergoing home parenteral nutrition." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **24**(4): 223-227.

Bilgic, B., A. Pfefferbaum, T. Rohlfing, E. V. Sullivan and E. Adalsteinsson (2012). "MRI estimates of brain iron concentration in normal aging using quantitative susceptibility mapping." *Neuroimage* **59**(3): 2625-2635.

Binolfi, A., E. E. Rodriguez, D. Valensin, N. D'Amelio, E. Ippoliti, G. Obal, R. Duran, A. Magistrato, O. Pritsch, M. Zweckstetter, G. Valensin, P. Carloni, L. Quintanar, C. Griesinger and C. O. Fernandez (2010). "Bioinorganic

chemistry of Parkinson's disease: structural determinants for the copper-mediated amyloid formation of alpha-synuclein." *Inorg Chem* **49**(22): 10668-10679.

Blahuta, J., T. Soukup, M. Jelinkova, P. Bartova, P. Cermak, R. Herzig and D. Skoloudik (2014). "A new program for highly reproducible automatic evaluation of the substantia nigra from transcranial sonographic images." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **158**(4): 621-627.

Boddaert, N., K. H. Le Quan Sang, A. Rotig, A. Leroy-Willig, S. Gallet, F. Brunelle, D. Sidi, J. C. Thalabard, A. Munnich and Z. I. Cabantchik (2007). "Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications." *Blood* **110**(1): 401-408.

Boeve, B. F. (2010). "REM sleep behavior disorder: Updated review of the core features, the REM sleep behavior disorder-neurodegenerative disease association, evolving concepts, controversies, and future directions." *Ann N Y Acad Sci* **1184**: 15-54.

Boeve, B. F., M. H. Silber, T. J. Ferman, J. A. Lucas and J. E. Parisi (2001). "Association of REM sleep behavior disorder and neurodegenerative disease may reflect an underlying synucleinopathy." *Mov Disord* **16**(4): 622-630.

Boeve, B. F., M. H. Silber, J. E. Parisi, D. W. Dickson, T. J. Ferman, E. E. Benarroch, A. M. Schmeichel, G. E. Smith, R. C. Petersen, J. E. Ahlskog, J. Y. Matsumoto, D. S. Knopman, C. H. Schenck and M. W. Mahowald (2003). "Synucleinopathy pathology and REM sleep behavior disorder plus dementia or parkinsonism." *Neurology* **61**(1): 40-45.

Bond, C. E. and S. A. Greenfield (2007). "Multiple cascade effects of oxidative stress on astroglia." *Glia* **55**(13): 1348-1361.

Bondi, M. W., E. C. Edmonds and D. P. Salmon (2017). "Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future." *J Int Neuropsychol Soc* **23**(9-10): 818-831.

Bor-Seng-Shu, E., F. M. Paschoal, K. J. Almeida, M. De Lima Oliveira, R. C. Nogueira, M. J. Teixeira and U. Walter (2019). "Transcranial brain sonography for Parkinsonian syndromes." *J Neurosurg Sci* **63**(4): 441-449.

Bor-Seng-Shu, E., J. L. Pedroso, A. C. Felicio, D. C. de Andrade, M. J. Teixeira, P. Braga-Neto, I. R. Batista, O. G. Barsottini, V. Borges, H. B. Ferraz, M. C. Shih, R. A. Bressan, L. A. de Andrade and U. Walter (2014). "Substantia nigra echogenicity and imaging of striatal dopamine transporters in Parkinson's disease: a cross-sectional study." *Parkinsonism Relat Disord* **20**(5): 477-481.

Bosoi, C. R. and C. F. Rose (2009). "Identifying the direct effects of ammonia on the brain." *Metab Brain Dis* **24**(1): 95-102.

Bost, M., S. Houdart, M. Oberli, E. Kalonji, J. F. Huneau and I. Margaritis (2016). "Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues." *J Trace Elem Med Biol* **35**: 107-115.

Boumezbeur, F., G. F. Mason, R. A. de Graaf, K. L. Behar, G. W. Cline, G. I. Shulman, D. L. Rothman and K. F. Petersen (2010). "Altered brain mitochondrial metabolism in healthy aging as assessed by in vivo magnetic resonance spectroscopy." *J Cereb Blood Flow Metab* **30**(1): 211-221.

Bouwman, A. E., A. M. Vlaar, K. Surljes, W. H. Mess and W. E. Weber (2010). "Transcranial sonography for the discrimination of idiopathic Parkinson's disease from the atypical parkinsonian syndromes." *Int Rev Neurobiol* **90**: 121-146.

Braak, H., K. Del Tredici, U. Rub, R. A. de Vos, E. N. Jansen Steur and E. Braak (2003). "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease." *Neurobiol Aging* **24**(2): 197-211.

Bradbury, M. W. (1997). "Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system." *J Neurochem* **69**(2): 443-454.

Bressler, J. P., L. Olivi, J. H. Cheong, Y. Kim, A. Maerten and D. Bannon (2007). "Metal transporters in intestine and brain: their involvement in metal-associated neurotoxicities." *Hum Exp Toxicol* **26**(3): 221-229.

Brookmeyer, R., S. Gray and C. Kawas (1998). "Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset." *Am J Public Health* **88**(9): 1337-1342.

Brooks, D. J., K. Seppi and M. S. A. Neuroimaging Working Group on (2009). "Proposed neuroimaging criteria for the diagnosis of multiple system atrophy." *Mov Disord* **24**(7): 949-964.

Buchner, J. (2019). "Molecular chaperones and protein quality control: an introduction to the JBC Reviews thematic series." *J Biol Chem* **294**(6): 2074-2075.

Carpenter, N. J. (1994). "Genetic anticipation. Expanding tandem repeats." *Neurol Clin* **12**(4): 683-697.

Castellanos, G., M. A. Fernandez-Seara, O. Lorenzo-Betancor, S. Ortega-Cubero, M. Puigvert, J. Uranga, M. Vidorreta, J. Irigoyen, E. Lorenzo, A. Munoz-Barrutia, C. Ortiz-de-Solorzano, P. Pastor and M. A. Pastor (2015). "Automated neuromelanin imaging as a diagnostic biomarker for Parkinson's disease." *Mov Disord* **30**(7): 945-952.

Castillo, X., S. Castro-Obregon, B. Gutierrez-Becker, G. Gutierrez-Ospina, N. Karalis, A. A. Khalil, J. S. Lopez-Noguerola, L. L. Rodriguez, E. Martinez-Martinez, C. Perez-Cruz, J. Perez-Velazquez, A. L. Pina, K. Rubio, H. P. S. Garcia, T. Syeda, A. Vanoye-Carlo, A. Villringer, K. Winek and M. Zille (2019). "Re-thinking the Etiological Framework of Neurodegeneration." *Front Neurosci* **13**: 728.

Clarke, C. E. (2007). "Parkinson's disease." *BMJ* **335**(7617): 441-445.

Clarkson, T. W. (1987). "Metal toxicity in the central nervous system." *Environ Health Perspect* **75**: 59-64.

Clavaguera, F., T. Bolmont, R. A. Crowther, D. Abramowski, S. Frank, A. Probst, G. Fraser, A. K. Stalder, M. Beibel, M. Staufenbiel, M. Jucker, M. Goedert and M. Tolnay (2009). "Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain." *Nat Cell Biol* **11**(7): 909-913.

Codazzi, F., I. Pelizzoni, D. Zacchetti and F. Grohovaz (2015). "Iron entry in neurons and astrocytes: a link with synaptic activity." *Front Mol Neurosci* **8**: 18.

Connor, J. R. and S. L. Menzies (1996). "Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination." *Glia* **17**(2): 83-93.

Cook, J. D. (1990). "Adaptation in iron metabolism." *Am J Clin Nutr* **51**(2): 301-308.

Cortelli, P., G. Calandra-Buonaura, E. E. Benarroch, G. Giannini, A. Iranzo, P. A. Low, P. Martinelli, F. Provini, N. Quinn, E. Tolosa, G. K. Wenning, G. Abbruzzese, P. Bower, E. Alfonsi, I. Ghorayeb, T. Ozawa, C. Paccetti, N. G. Pozzi, C. Vicini, A. Antonini, K. P. Bhatia, J. Bonavita, H. Kaufmann, M. T. Pellecchia, N. Pizzorni, A. Schindler, F. Tison, L. Vignatelli and W. G. Meissner (2019). "Stridor in multiple system atrophy: Consensus statement on diagnosis, prognosis, and treatment." *Neurology* **93**(14): 630-639.

Cosottini, M., D. Frosini, I. Pesaresi, M. Costagli, L. Biagi, R. Ceravolo, U. Bonuccelli and M. Tosetti (2014). "MR imaging of the substantia nigra at 7 T enables diagnosis of Parkinson disease." *Radiology* **271**(3): 831-838.

Cossu, G., G. Abbruzzese, G. L. Forni, G. Matta, V. Pinto, U. Ruffinengo, V. Oppo and R. Marchese (2019). "Efficacy and safety of deferiprone for the treatment of superficial siderosis: results from a long-term observational study." *Neurol Sci* **40**(7): 1357-1361.

Coyle, P., J. C. Philcox, L. C. Carey and A. M. Rofe (2002). "Metallothionein: the multipurpose protein." *Cell Mol Life Sci* **59**(4): 627-647.

Crapper McLachlan, D. R., A. J. Dalton, T. P. Kruck, M. Y. Bell, W. L. Smith, W. Kalow and D. F. Andrews (1991). "Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease." *Lancet* **337**(8753): 1304-1308.

Culebras, A. and J. T. Moore (1989). "Magnetic resonance findings in REM sleep behavior disorder." *Neurology* **39**(11): 1519-1523.

Cummings, J. N. (1948). "The copper and iron content of brain and liver in the normal and in hepato-lenticular degeneration." *Brain* **71**(Pt. 4): 410-415.

Curtis, A. R., C. Fey, C. M. Morris, L. A. Bindoff, P. G. Ince, P. F. Chinnery, A. Coulthard, M. J. Jackson, A. P. Jackson, D. P. McHale, D. Hay, W. A. Barker, A. F. Markham, D. Bates, A. Curtis and J. Burn (2001). "Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease." *Nat Genet* **28**(4): 350-354.

Daglas, M. and P. A. Adlard (2018). "The Involvement of Iron in Traumatic Brain Injury and Neurodegenerative Disease." *Front Neurosci* **12**: 981.

Dansie, L. E., S. Reeves, K. Miller, S. P. Zano, M. Frank, C. Pate, J. Wang and S. Jackowski (2014). "Physiological roles of the pantothenate kinases." *Biochem Soc Trans* **42**(4): 1033-1036.

Danzer, K. M., S. K. Krebs, M. Wolff, G. Birk and B. Hengerer (2009). "Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology." *J Neurochem* **111**(1): 192-203.

Davison, E. J., K. Pennington, C. C. Hung, J. Peng, R. Rafiq, A. Ostareck-Lederer, D. H. Ostareck, H. C. Ardley, R. E. Banks and P. A. Robinson (2009). "Proteomic analysis of increased Parkin expression and its interactants provides evidence for a role in modulation of mitochondrial function." *Proteomics* **9**(18): 4284-4297.

De Felice, F. G., D. Wu, M. P. Lambert, S. J. Fernandez, P. T. Velasco, P. N. Lacor, E. H. Bigio, J. Jerecic, P. J. Acton, P. J. Shughrue, E. Chen-Dodson, G. G. Kinney and W. L. Klein (2008). "Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers." *Neurobiol Aging* **29**(9): 1334-1347.

De Vos, K. J., A. J. Grierson, S. Ackerley and C. C. Miller (2008). "Role of axonal transport in neurodegenerative diseases." *Annu Rev Neurosci* **31**: 151-173.

Delaere, P., Y. He, G. Fayet, C. Duyckaerts and J. J. Hauw (1993). "Beta A4 deposits are constant in the brain of the oldest old: an immunocytochemical study of 20 French centenarians." *Neurobiol Aging* **14**(2): 191-194.

Delangle, P. and E. Mintz (2012). "Chelation therapy in Wilson's disease: from d-penicillamine to the design of selective bioinspired intracellular Cu(i) chelators." *Dalton Trans* **41**(21): 6359-6370.

Deutschlander, A. B., O. A. Ross, D. W. Dickson and Z. K. Wszolek (2018). "Atypical parkinsonian syndromes: a general neurologist's perspective." *Eur J Neurol* **25**(1): 41-58.

Dexter, D. T., F. R. Wells, A. J. Lees, F. Agid, Y. Agid, P. Jenner and C. D. Marsden (1989). "Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease." *J Neurochem* **52**(6): 1830-1836.

Dickson, D. W., C. Bergeron, S. S. Chin, C. Duyckaerts, D. Horoupian, K. Ikeda, K. Jellinger, P. L. Lantos, C. F. Lippa, S. S. Mirra, M. Tabaton, J. P. Vonsattel, K. Wakabayashi, I. Litvan and H. Office of Rare Diseases of the National Institutes of (2002). "Office of Rare Diseases neuropathologic criteria for corticobasal degeneration." *J Neuropathol Exp Neurol* **61**(11): 935-946.

Dietrich, O., J. Levin, S. A. Ahmadi, A. Plate, M. F. Reiser, K. Botzel, A. Giese and B. Ertl-Wagner (2017). "MR imaging differentiation of Fe(2+) and Fe(3+) based on relaxation and magnetic susceptibility properties." *Neuroradiology* **59**(4): 403-409.

Dobrowolska, J., M. Dehnhardt, A. Matusch, M. Zoriy, N. Palomero-Gallagher, P. Koscielniak, K. Zilles and J. S. Becker (2008). "Quantitative imaging of zinc, copper and lead in three distinct regions of the human brain by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry." *Talanta* **74**(4): 717-723.

Doepf, F., M. Plotkin, L. Siegel, A. Kivi, D. Gruber, E. Lobsien, A. Kupsch and S. J. Schreiber (2008). "Brain parenchyma sonography and 123I-FP-CIT SPECT in Parkinson's disease and essential tremor." *Mov Disord* **23**(3): 405-410.

Donaghy, P. C., N. Barnett, K. Olsen, J. P. Taylor, I. G. McKeith, J. T. O'Brien and A. J. Thomas (2017). "Symptoms associated with Lewy body disease in mild cognitive impairment." *Int J Geriatr Psychiatry* **32**(11): 1163-1171.

Dos Santos Picanco, L. C., P. F. Ozela, M. de Fatima de Brito Brito, A. A. Pinheiro, E. C. Padilha, F. S. Braga, C. H. T. de Paula da Silva, C. B. R. Dos Santos, J. M. C. Rosa and L. I. da Silva Hage-Melim (2018). "Alzheimer's Disease:

A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment." *Curr Med Chem* **25**(26): 3141-3159.

Drayer, B., P. Burger, R. Darwin, S. Riederer, R. Herfkens and G. A. Johnson (1986). "MRI of brain iron." *AJR Am J Roentgenol* **147**(1): 103-110.

Drepper, C., J. Geissler, G. Pastura, R. Yilmaz, D. Berg, M. Romanos and M. Gerlach (2018). "Transcranial sonography in psychiatry as a potential tool in diagnosis and research." *World J Biol Psychiatry* **19**(7): 484-496.

Du, G., T. Liu, M. M. Lewis, L. Kong, Y. Wang, J. Connor, R. B. Mailman and X. Huang (2016). "Quantitative susceptibility mapping of the midbrain in Parkinson's disease." *Mov Disord* **31**(3): 317-324.

Dubinsky, J. M. (2009). "Heterogeneity of nervous system mitochondria: location, location, location!" *Exp Neurol* **218**(2): 293-307.

Ducray, A., J. R. Bondier, G. Michel, K. Bon, J. L. Millot, A. Propper and A. Kastner (2002). "Recovery following peripheral destruction of olfactory neurons in young and adult mice." *Eur J Neurosci* **15**(12): 1907-1917.

Dusek, P., E. Bahn, T. Litwin, K. Jablonka-Salach, A. Luciuk, T. Huelnhagen, V. I. Madai, M. A. Dieringer, E. Bulska, M. Knauth, T. Niendorf, J. Sobesky, F. Paul, S. A. Schneider, A. Czlonkowska, W. Bruck, C. Wegner and J. Wuerfel (2017). "Brain iron accumulation in Wilson disease: a post mortem 7 Tesla MRI - histopathological study." *Neuropathol Appl Neurobiol* **43**(6): 514-532.

Dusek, P., M. Dezortova and J. Wuerfel (2013). "Imaging of iron." *Int Rev Neurobiol* **110**: 195-239.

Dusek, P., V. Ibarburu, O. Bezdicek, I. Dall'antonia, S. Dostalova, P. Kovalska, R. Krupicka, J. Nepozitek, T. Nikolai, M. Novotny, P. Perinova, J. Ruzs, T. Serranova, T. Tykalova, O. Ulmanova, Z. Meckova, V. Ptačnik, J. Trnka, D. Zogala, E. Ruzicka and K. Sonka (2019). "Relations of non-motor symptoms and dopamine transporter binding in REM sleep behavior disorder." *Sci Rep* **9**(1): 15463.

Dusek, P., P. M. Roos, T. Litwin, S. A. Schneider, T. P. Flaten and J. Aaseth (2015). "The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases." *J Trace Elem Med Biol* **31**: 193-203.

Duyn, J. (2013). "MR susceptibility imaging." *J Magn Reson* **229**: 198-207.

Duyn, J. H. and J. Schenck (2017). "Contributions to magnetic susceptibility of brain tissue." *NMR Biomed* **30**(4).

Eapen, V., R. Baker, A. Walter, V. Raghupathy, J. J. Wehrman and P. F. Sowman (2017). "The Role of Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) in Tourette Syndrome: A Review and Preliminary Findings." *Brain Sci* **7**(12).

Ecroyd, H. and J. A. Carver (2008). "Unraveling the mysteries of protein folding and misfolding." *IUBMB Life* **60**(12): 769-774.

Eisensehr, I., R. Linke, K. Tatsch, B. Kharraz, J. F. Gildehaus, C. T. Wetter, C. Trenkwalder, J. Schwarz and S. Noachtar (2003). "Increased muscle activity during rapid eye movement sleep correlates with decrease of striatal presynaptic dopamine transporters. IPT and IBZM SPECT imaging in subclinical and clinically manifest idiopathic REM sleep behavior disorder, Parkinson's disease, and controls." *Sleep* **26**(5): 507-512.

El-Agnaf, O. M. and G. B. Irvine (2000). "Review: formation and properties of amyloid-like fibrils derived from alpha-synuclein and related proteins." *J Struct Biol* **130**(2-3): 300-309.

Ellmore, T. M., A. J. Hood, R. J. Castriotta, E. F. Stimming, R. J. Bick and M. C. Schiess (2010). "Reduced volume of the putamen in REM sleep behavior disorder patients." *Parkinsonism Relat Disord* **16**(10): 645-649.

Erikson, K. M., T. Syversen, J. L. Aschner and M. Aschner (2005). "Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration." *Environ Toxicol Pharmacol* **19**(3): 415-421.

Esteves, A. R., D. M. Arduino, R. H. Swerdlow, C. R. Oliveira and S. M. Cardoso (2010). "Microtubule depolymerization potentiates alpha-synuclein oligomerization." *Front Aging Neurosci* **1**: 5.

European Association for Study of, L. (2012). "EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease." *J Hepatol* **56**(3): 671-685.

Fan, H. C., L. I. Ho, C. S. Chi, S. J. Chen, G. S. Peng, T. M. Chan, S. Z. Lin and H. J. Harn (2014). "Polyglutamine (PolyQ) diseases: genetics to treatments." *Cell Transplant* **23**(4-5): 441-458.

Fang, C., L. Gu, D. Smerin, S. Mao and X. Xiong (2017). "The Interrelation between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Neurological Disorders." *Oxid Med Cell Longev* **2017**: 8495160.

Favaretto, S., U. Walter, C. Baracchini, S. Pompanin, C. Busse, G. Zorzi, M. Ermani and A. Cagnin (2016). "Accuracy of transcranial brain parenchyma sonography in the diagnosis of dementia with Lewy bodies." *Eur J Neurol* **23**(8): 1322-1328.

Fedorow, H., G. M. Halliday, C. H. Rickert, M. Gerlach, P. Riederer and K. L. Double (2006). "Evidence for specific phases in the development of human neuromelanin." *Neurobiol Aging* **27**(3): 506-512.

Ferenci, P. (2004). "Pathophysiology and clinical features of Wilson disease." *Metab Brain Dis* **19**(3-4): 229-239.

Ferenci, P., K. Caca, G. Loudianos, G. Mieli-Vergani, S. Tanner, I. Sternlieb, M. Schilsky, D. Cox and F. Berr (2003). "Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease." *Liver Int* **23**(3): 139-142.

Ferenci, P., T. Litwin, J. Seniow and A. Czlonkowska (2015). "Encephalopathy in Wilson disease: copper toxicity or liver failure?" *J Clin Exp Hepatol* **5**(Suppl 1): S88-95.

Ferenci, P. and P. Ott (2019). "Wilson's disease: Fatal when overlooked, curable when diagnosed." *J Hepatol* **71**(1): 222-224.

Ferman, T. J., G. E. Smith, B. F. Boeve, R. J. Ivnik, R. C. Petersen, D. Knopman, N. Graff-Radford, J. Parisi and D. W. Dickson (2004). "DLB fluctuations: specific features that reliably differentiate DLB from AD and normal aging." *Neurology* **62**(2): 181-187.

Fernandes Rde, C., A. L. Rosso, M. B. Vincent, K. S. Silva, C. Bonan, N. C. Araujo and D. Berg (2011). "Transcranial sonography as a diagnostic tool for Parkinson's disease: a pilot study in the city of Rio de Janeiro, Brazil." *Arg Neuropsiquiatr* **69**(6): 892-895.

Fernandez, B., I. Ferrer, F. Gil and S. Hilfiker (2017). "Biomonitorization of iron accumulation in the substantia nigra from Lewy body disease patients." *Toxicol Rep* **4**: 188-193.

Fitsanakis, V. A., N. Zhang, J. G. Anderson, K. M. Erikson, M. J. Avison, J. C. Gore and M. Aschner (2008). "Measuring brain manganese and iron accumulation in rats following 14 weeks of low-dose manganese treatment using atomic absorption spectroscopy and magnetic resonance imaging." *Toxicol Sci* **103**(1): 116-124.

Fitzgerald, K., V. Mikalunas, H. Rubin, R. McCarthey, A. Vanagunas and R. M. Craig (1999). "Hypermanganesemia in patients receiving total parenteral nutrition." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **23**(6): 333-336.

Floris, G., R. Medda, A. Padiglia and G. Musci (2000). "The physiopathological significance of ceruloplasmin. A possible therapeutic approach." *Biochem Pharmacol* **60**(12): 1735-1741.

Fontaine, S. N., J. J. Sabbagh, J. Baker, C. R. Martinez-Licha, A. Darling and C. A. Dickey (2015). "Cellular factors modulating the mechanism of tau protein aggregation." *Cell Mol Life Sci* **72**(10): 1863-1879.

Fraigne, J. J., Z. A. Torontali, M. B. Snow and J. H. Peever (2015). "REM Sleep at its Core - Circuits, Neurotransmitters, and Pathophysiology." *Front Neurol* **6**: 123.

Francis, P. T. (2005). "The interplay of neurotransmitters in Alzheimer's disease." *CNS Spectr* **10**(11 Suppl 18): 6-9.

Frost, B., R. L. Jacks and M. I. Diamond (2009). "Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell." *J Biol Chem* **284**(19): 12845-12852.

Frota, N. A., E. R. Barbosa, C. S. Porto, L. T. Lucato, C. R. Ono, C. A. Buchpiguel and P. Caramelli (2013). "Cognitive impairment and magnetic resonance imaging correlations in Wilson's disease." *Acta Neurol Scand* **127**(6): 391-398.

Fu, S., W. Jiang and W. Zheng (2015). "Age-dependent increase of brain copper levels and expressions of copper regulatory proteins in the subventricular zone and choroid plexus." *Front Mol Neurosci* **8**: 22.

Fujioka, M., T. Taoka, Y. Matsuo, K. Mishima, K. Ogoshi, Y. Kondo, M. Tsuda, M. Fujiwara, T. Asano, T. Sakaki, A. Miyasaki, D. Park and B. K. Siesjo (2003). "Magnetic resonance imaging shows delayed ischemic striatal neurodegeneration." *Ann Neurol* **54**(6): 732-747.

Gaenslen, A. (2010). "Transcranial sonography in dystonia." *Int Rev Neurobiol* **90**: 179-187.

Gaenslen, A., B. Unmuth, J. Godau, I. Liepelt, A. Di Santo, K. J. Schweitzer, T. Gasser, H. J. Machulla, M. Reimold, K. Marek and D. Berg (2008). "The specificity and sensitivity of transcranial ultrasound in the differential diagnosis of Parkinson's disease: a prospective blinded study." *Lancet Neurol* **7**(5): 417-424.

Galbiati, A., L. Verga, E. Giora, M. Zucconi and L. Ferini-Strambi (2019). "The risk of neurodegeneration in REM sleep behavior disorder: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies." *Sleep Med Rev* **43**: 37-46.

Galluzzi, L., I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E. H. Baehrecke, N. A. Barlev, N. G. Bazan, F. Bernassola, M. J. M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona-Gutierrez, F. Cecconi, F. K. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J. R. Cubillos-Ruiz, P. E. Czabotar, V. D'Angiolella, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K. M. Debatin, R. J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V. M. Dixit, S. J. Dixon, C. S. Duckett, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, J. W. Elrod, G. M. Fimia, S. Fulda, A. J. Garcia-Saez, A. D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L. A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, I. S. Harris, M. O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jaattela, B. Joseph, P. J. Jost, P. P. Juin, W. J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Kepp, A. Kimchi, R. N. Kitsis, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, S. W. Lee, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. Lopez-Otin, S. W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J. C. Marine, S. J. Martin, J. C. Martinou, J. P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E. A. Miao, J. D. Molkenin, U. M. Moll, C. Munoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nunez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J. M. Penninger, D. M. Pereira, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C. M. P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, K. M. Ryan, E. Sayan, L. Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H. U. Simon, A. Sistigu, B. R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S. W. G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, M. G. Vander Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K. H. Vousden, D. Vucic, E. F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J. A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino and G. Kroemer (2018). "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." *Cell Death Differ* **25**(3): 486-541.

Ganz, T. and E. Nemeth (2012). "Hepcidin and iron homeostasis." *Biochim Biophys Acta* **1823**(9): 1434-1443.

Gao, H. M., P. T. Kotzbauer, K. Uryu, S. Leight, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2008). "Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration." *J Neurosci* **28**(30): 7687-7698.

Garcia-Lorenzo, D., C. Longo-Dos Santos, C. Eweczyk, S. Leu-Semenescu, C. Gallea, G. Quattrocchi, P. Pita Lobo, C. Poupon, H. Benali, I. Arnulf, M. Vidailhet and S. Lehericy (2013). "The coeruleus/subcoeruleus complex in rapid eye movement sleep behaviour disorders in Parkinson's disease." *Brain* **136**(Pt 7): 2120-2129.

Ghadery, C., L. Pirpamer, E. Hofer, C. Langkammer, K. Petrovic, M. Loitfelder, P. Schwingsenschuh, S. Seiler, M. Dering, E. Jouvent, H. Schmidt, F. Fazekas, J. F. Mangin, H. Chabriat, M. Dichgans, S. Ropele and R. Schmidt (2015). "R2* mapping for brain iron: associations with cognition in normal aging." *Neurobiol Aging* **36**(2): 925-932.

Ginat, D. T. and S. P. Meyers (2012). "Intracranial lesions with high signal intensity on T1-weighted MR images: differential diagnosis." Radiographics **32**(2): 499-516.

Go, C. L., A. Frenzel, R. L. Rosales, L. V. Lee, R. Benecke, D. Dressler and U. Walter (2012). "Assessment of substantia nigra echogenicity in German and Filipino populations using a portable ultrasound system." J Ultrasound Med **31**(2): 191-196.

Goedert, M. and R. Jakes (2005). "Mutations causing neurodegenerative tauopathies." Biochim Biophys Acta **1739**(2-3): 240-250.

Goetz, C. G., B. C. Tilley, S. R. Shaftman, G. T. Stebbins, S. Fahn, P. Martinez-Martin, W. Poewe, C. Sampaio, M. B. Stern, R. Dodel, B. Dubois, R. Holloway, J. Jankovic, J. Kulisevsky, A. E. Lang, A. Lees, S. Leurgans, P. A. LeWitt, D. Nyenhuis, C. W. Olanow, O. Rascol, A. Schrag, J. A. Teresi, J. J. van Hilten, N. LaPelle and U. R. T. F. Movement Disorder Society (2008). "Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results." Mov Disord **23**(15): 2129-2170.

Goldman, J. G., S. R. Eichensteiner, E. Berry-Kravis, S. Zimnowodzki, A. Gregory, P. Hogarth and S. J. Hayflick (2013). "Clinical features of neurodegeneration with brain iron accumulation due to a C19orf12 gene mutation." Mov Disord **28**(10): 1462-1463.

Gomber, S., R. Saxena and N. Madan (2004). "Comparative efficacy of desferrioxamine, deferiprone and in combination on iron chelation in thalassemic children." Indian Pediatr **41**(1): 21-27.

Gorell, J. M., C. C. Johnson, B. A. Rybicki, E. L. Peterson, G. X. Kortsha, G. G. Brown and R. J. Richardson (1999). "Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease." Neurotoxicology **20**(2-3): 239-247.

Gregory, A., M. Hartig, H. Prokisch, T. Kmiec, P. Hogarth and S. J. Hayflick (1993). Mitochondrial Membrane Protein-Associated Neurodegeneration. GeneReviews(R). M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon et al. Seattle (WA).

Gregory, A. and S. Hayflick (1993). Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation Disorders Overview. GeneReviews(R). M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon et al. Seattle (WA).

Gregory, A. and S. J. Hayflick (1993). Pantothenate Kinase-Associated Neurodegeneration. GeneReviews(R). M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon et al. Seattle (WA).

Gulec, S. and J. F. Collins (2014). "Molecular mediators governing iron-copper interactions." Annu Rev Nutr **34**: 95-116.

Gunzburg, M. J., M. A. Perugini and G. J. Howlett (2007). "Structural basis for the recognition and cross-linking of amyloid fibrils by human apolipoprotein E." J Biol Chem **282**(49): 35831-35841.

Gupta, A. and S. Lutsenko (2009). "Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential." Future Med Chem **1**(6): 1125-1142.

Haacke, E. M., N. Y. Cheng, M. J. House, Q. Liu, J. Neelavalli, R. J. Ogg, A. Khan, M. Ayaz, W. Kirsch and A. Obenaus (2005). "Imaging iron stores in the brain using magnetic resonance imaging." Magn Reson Imaging **23**(1): 1-25.

Hagenah, J., I. R. Konig, J. Sperner, L. Wessel, G. Seidel, K. Condefer, R. Saunders-Pullman, C. Klein and N. Bruggemann (2010). "Life-long increase of substantia nigra hyperechogenicity in transcranial sonography." Neuroimage **51**(1): 28-32.

Halefoglu, A. M. and D. M. Yousem (2018). "Susceptibility weighted imaging: Clinical applications and future directions." World J Radiol **10**(4): 30-45.

Hallgren, B. and P. Sourander (1958). "The effect of age on the non-haemin iron in the human brain." J Neurochem **3**(1): 41-51.

Hami, J., M. Hosseini, S. Shahi, N. Lotfi, A. Talebi and M. Afshar (2015). "Effects of L-arginine pre-treatment in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's diseases in Balb/c mice." Iran J Neurol **14**(4): 195-203.

Han, C., Y. Liu, R. Dai, N. Ismail, W. Su and B. Li (2020). "Ferroptosis and Its Potential Role in Human Diseases." Front Pharmacol **11**: 239.

Han, Y. H., J. H. Lee, B. M. Kang, C. W. Mun, S. K. Baik, Y. I. Shin and K. H. Park (2013). "Topographical differences of brain iron deposition between progressive supranuclear palsy and parkinsonian variant multiple system atrophy." J Neurol Sci **325**(1-2): 29-35.

Harmer, A., C. Wozny, B. R. Rost, L. M. Munter, H. Hua, O. Georgiev, M. Beyermann, P. W. Hildebrand, C. Weise, W. Schaffner, D. Schmitz and G. Multhaup (2009). "Role of amyloid-beta glycine 33 in oligomerization, toxicity, and neuronal plasticity." J Neurosci **29**(23): 7582-7590.

Harrington, A. W. and D. D. Ginty (2013). "Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons." Nat Rev Neurosci **14**(3): 177-187.

Harrison, M. D., C. E. Jones, M. Solioz and C. T. Dameron (2000). "Intracellular copper routing: the role of copper chaperones." Trends Biochem Sci **25**(1): 29-32.

Hauser, R. A., T. A. Zesiewicz, A. S. Rosemurgy, C. Martinez and C. W. Olanow (1994). "Manganese intoxication and chronic liver failure." Ann Neurol **36**(6): 871-875.

Hayashi, H., Y. Fujita, Y. Tatsumi, A. Hattori, K. Hayashi, Y. Katano, S. Wakusawa, M. Yano, M. Itoh, N. Mizutani and H. Goto (2009). "Special stain and X-ray probe microanalysis of livers with Wilson disease." Hepatol Res **39**(6): 563-568.

Hayashi, H., A. Hattori, Y. Tatsumi, K. Hayashi, Y. Katano, J. Ueyama, S. Wakusawa, M. Yano and H. Goto (2013). "Various copper and iron overload patterns in the livers of patients with Wilson disease and idiopathic copper toxicosis." Med Mol Morphol **46**(3): 133-140.

Hayashi, H., M. Yano, Y. Fujita and S. Wakusawa (2006). "Compound overload of copper and iron in patients with Wilson's disease." Med Mol Morphol **39**(3): 121-126.

He, J., X. Yang, B. Men and D. Wang (2016). "Interfacial mechanisms of heterogeneous Fenton reactions catalyzed by iron-based materials: A review." J Environ Sci (China) **39**: 97-109.

Heller, J., N. Brcina, I. Dogan, F. Holtbernd, S. Romanzetti, J. B. Schulz, J. Schiefer and K. Reetz (2017). "Brain imaging findings in idiopathic REM sleep behavior disorder (RBD) - A systematic review on potential biomarkers for neurodegeneration." Sleep Med Rev **34**: 23-33.

Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, B. Galy and C. Camaschella (2010). "Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism." Cell **142**(1): 24-38.

Hermann, W. (2014). "Morphological and functional imaging in neurological and non-neurological Wilson's patients." Ann N Y Acad Sci **1315**: 24-29.

Hermann, W. (2019). "Classification and differential diagnosis of Wilson's disease." Ann Transl Med **7**(Suppl 2): S63.

Herrero, M. T., C. Barcia and J. M. Navarro (2002). "Functional anatomy of thalamus and basal ganglia." Childs Nerv Syst **18**(8): 386-404.

Hida, A., H. Kowa, A. Iwata, M. Tanaka, S. Kwak and S. Tsuji (2010). "Aceruloplasminemia in a Japanese woman with a novel mutation of CP gene: clinical presentations and analysis of genetic and molecular pathogenesis." J Neurol Sci **298**(1-2): 136-139.

Hogarth, P. (2015). "Neurodegeneration with brain iron accumulation: diagnosis and management." J Mov Disord **8**(1): 1-13.

Hogl, B., A. Stefani and A. Videnovic (2018). "Idiopathic REM sleep behaviour disorder and neurodegeneration - an update." Nat Rev Neurol **14**(1): 40-55.

Hotter, A., R. Esterhammer, M. F. Schocke and K. Seppi (2009). "Potential of advanced MR imaging techniques in the differential diagnosis of parkinsonism." Mov Disord **24** Suppl 2: S711-720.

Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." Annu Rev Neurosci **24**: 677-736.

Huber, H. (2010). "Transcranial sonography--anatomy." Int Rev Neurobiol **90**: 35-45.

Hubert, N. and M. W. Hentze (2002). "Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12345-12350.

Hunt, J. R., C. A. Zito and L. K. Johnson (2009). "Body iron excretion by healthy men and women." Am J Clin Nutr **89**(6): 1792-1798.

Chang, I. J. and S. H. Hahn (2017). "The genetics of Wilson disease." Handb Clin Neurol **142**: 19-34.

Chaudhuri, K. R., D. G. Healy, A. H. Schapira and E. National Institute for Clinical (2006). "Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management." Lancet Neurol **5**(3): 235-245.

Chen, C., B. Shen, J. J. Xiao, R. Wu, S. J. Duff Canning and X. P. Wang (2015). "Currently Clinical Views on Genetics of Wilson's Disease." Chin Med J (Engl) **128**(13): 1826-1830.

Chen, J. C., P. A. Hardy, M. Clauberg, J. G. Joshi, J. Parravano, J. H. Deck, R. M. Henkelman, L. E. Becker and W. Kucharczyk (1989). "T2 values in the human brain: comparison with quantitative assays of iron and ferritin." Radiology **173**(2): 521-526.

Chen, J. C., P. A. Hardy, W. Kucharczyk, M. Clauberg, J. G. Joshi, A. Vourlas, M. Dhar and R. M. Henkelman (1993). "MR of human postmortem brain tissue: correlative study between T2 and assays of iron and ferritin in Parkinson and Huntington disease." AJNR Am J Neuroradiol **14**(2): 275-281.

Chen, P., J. Bornhorst and M. Aschner (2018). "Manganese metabolism in humans." Front Biosci (Landmark Ed) **23**: 1655-1679.

Chen, Q., X. P. Chen, L. Zou, D. Zhou, Q. Y. Gong, J. M. Burgunder and H. F. Shang (2008). "High brain iron level in asymptomatic carriers of heterozygous ceruloplasmin gene mutations." Mov Disord **23**(6): 916-917.

Chen, S. T., P. Siddarth, L. M. Ercoli, D. A. Merrill, F. Torres-Gil and G. W. Small (2014). "Modifiable risk factors for Alzheimer disease and subjective memory impairment across age groups." PLoS One **9**(6): e98630.

Chinnery, P. F. (1993). Neuroferritinopathy. GeneReviews((R)). M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon et al. Seattle (WA).

Chinnery, P. F., D. E. Crompton, D. Birchall, M. J. Jackson, A. Coulthard, A. Lombes, N. Quinn, A. Wills, N. Fletcher, J. P. Mottershead, P. Cooper, M. Kellett, D. Bates and J. Burn (2007). "Clinical features and natural history of neuroferritinopathy caused by the FTL1 460InsA mutation." Brain **130**(Pt 1): 110-119.

Choi, B. S. and W. Zheng (2009). "Copper transport to the brain by the blood-brain barrier and blood-CSF barrier." Brain Res **1248**: 14-21.

Chow, V. W., M. P. Mattson, P. C. Wong and M. Gleichmann (2010). "An overview of APP processing enzymes and products." Neuromolecular Med **12**(1): 1-12.

Iancu, T. C. (1992). "Ferritin and hemosiderin in pathological tissues." Electron Microsc Rev **5**(2): 209-229.

Imamura, A., Z. Wszolek and R. Uitti (2007). "Neurodegenerative overlap syndrome: Parkinsonism and motor neuron disorder." Mov Disord **22**(1): 151-152.

Inesi, G. (2017). "Molecular features of copper binding proteins involved in copper homeostasis." IUBMB Life **69**(4): 211-217.

Iova, A., A. Garmashov, N. Androuchtchenko, M. Kehrer, D. Berg, G. Becker and Y. Garmashov (2004). "Postnatal decrease in substantia nigra echogenicity. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease." *J Neurol* **251**(12): 1451-1454.

Iranzo, A., A. Fernandez-Arcos, E. Tolosa, M. Serradell, J. L. Molinuevo, F. Valldeoriola, E. Gelpi, I. Vilaseca, R. Sanchez-Valle, A. Llado, C. Gaig and J. Santamaria (2014). "Neurodegenerative disorder risk in idiopathic REM sleep behavior disorder: study in 174 patients." *PLoS One* **9**(2): e89741.

Iranzo, A., F. Lomena, H. Stockner, F. Valldeoriola, I. Vilaseca, M. Salamero, J. L. Molinuevo, M. Serradell, J. Duch, J. Pavia, J. Gallego, K. Seppi, B. Hogl, E. Tolosa, W. Poewe, J. Santamaria and g. Sleep Innsbruck Barcelona (2010). "Decreased striatal dopamine transporter uptake and substantia nigra hyperechogenicity as risk markers of synucleinopathy in patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a prospective study [corrected]." *Lancet Neurol* **9**(11): 1070-1077.

Iranzo, A., J. L. Molinuevo, J. Santamaria, M. Serradell, M. J. Marti, F. Valldeoriola and E. Tolosa (2006). "Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study." *Lancet Neurol* **5**(7): 572-577.

Iranzo, A., J. Santamaria, F. Valldeoriola, M. Serradell, M. Salamero, C. Gaig, A. Ninerola-Baizan, R. Sanchez-Valle, A. Llado, R. De Marzi, A. Stefani, K. Seppi, J. Pavia, B. Hogl, W. Poewe, E. Tolosa and F. Lomena (2017). "Dopamine transporter imaging deficit predicts early transition to synucleinopathy in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder." *Ann Neurol* **82**(3): 419-428.

Iranzo, A., H. Stockner, M. Serradell, K. Seppi, F. Valldeoriola, B. Frauscher, J. L. Molinuevo, I. Vilaseca, T. Mitterling, C. Gaig, D. Vilas, J. Santamaria, B. Hogl, E. Tolosa and W. Poewe (2014). "Five-year follow-up of substantia nigra echogenicity in idiopathic REM sleep behavior disorder." *Mov Disord* **29**(14): 1774-1780.

Ishizawa, K., T. Komori, N. Arai, T. Mizutani and T. Hirose (2008). "Glial cytoplasmic inclusions and tissue injury in multiple system atrophy: A quantitative study in white matter (olivopontocerebellar system) and gray matter (nigrostriatal system)." *Neuropathology* **28**(3): 249-257.

Iwanami, M., T. Miyamoto, M. Miyamoto, K. Hirata and E. Takada (2010). "Relevance of substantia nigra hyperechogenicity and reduced odor identification in idiopathic REM sleep behavior disorder." *Sleep Med* **11**(4): 361-365.

Jellinger, K. A. (2010). "Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update." *J Cell Mol Med* **14**(3): 457-487.

Jennings, D., A. Siderowf, M. Stern, J. Seibyl, S. Eberly, D. Oakes, K. Marek and P. Investigators (2017). "Conversion to Parkinson Disease in the PARS Hyposmic and Dopamine Transporter-Deficit Prodromal Cohort." *JAMA Neurol* **74**(8): 933-940.

Jimenez-Jimenez, F. J., J. A. Molina, M. V. Aguilar, I. Meseguer, C. J. Mateos-Vega, M. J. Gonzalez-Munoz, F. de Bustos, A. Martinez-Salio, M. Orti-Pareja, M. Zurdo and M. C. Martinez-Para (1998). "Cerebrospinal fluid levels of transition metals in patients with Parkinson's disease." *J Neural Transm (Vienna)* **105**(4-5): 497-505.

Kanda, T., Y. Nakai, S. Aoki, H. Oba, K. Toyoda, K. Kitajima and S. Furui (2016). "Contribution of metals to brain MR signal intensity: review articles." *Jpn J Radiol* **34**(4): 258-266.

Kawahara, M., D. Mizuno, H. Koyama, K. Konoha, S. Ohkawara and Y. Sadakane (2014). "Disruption of zinc homeostasis and the pathogenesis of senile dementia." *Metallomics* **6**(2): 209-219.

Kazantsev, A. G. and A. M. Kolchinsky (2008). "Central role of alpha-synuclein oligomers in neurodegeneration in Parkinson disease." *Arch Neurol* **65**(12): 1577-1581.

Kellner, A., J. Matschke, C. Bernreuther, H. Moch, I. Ferrer and M. Glatzel (2009). "Autoantibodies against beta-amyloid are common in Alzheimer's disease and help control plaque burden." *Ann Neurol* **65**(1): 24-31.

Kern, R., F. Perren, S. Kreisel, K. Szabo, M. Hennerici and S. Meairs (2005). "Multiplanar transcranial ultrasound imaging: standards, landmarks and correlation with magnetic resonance imaging." *Ultrasound Med Biol* **31**(3): 311-315.

Kim, J. M., S. B. Ko, S. J. Kwon, H. J. Kim, M. K. Han, D. W. Kim, S. S. Cho and B. S. Jeon (2005). "Ferrous and ferric iron accumulates in the brain of aged Long-Evans Cinnamon rats, an animal model of Wilson's disease." *Neurosci Lett* **382**(1-2): 143-147.

Kim, T. J., I. O. Kim, W. S. Kim, J. E. Cheon, S. G. Moon, J. W. Kwon, J. K. Seo and K. M. Yeon (2006). "MR imaging of the brain in Wilson disease of childhood: findings before and after treatment with clinical correlation." *AJNR Am J Neuroradiol* **27**(6): 1373-1378.

Kim, W. S., K. Kagedal and G. M. Halliday (2014). "Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases." *Alzheimers Res Ther* **6**(5): 73.

Kim Y, P. J., Choi Y, Yoo CI, Lee CR, Lee H, et al. (2005). "Blood manganese concentration is elevated in iron deficiency anemia patients, whereas globus pallidus signal intensity is minimally affected." *Neurotoxicology*(26): 107-111.

King, A. D., J. M. Walshe, B. E. Kendall, R. J. Chinn, M. N. Paley, I. D. Wilkinson, S. Halligan and M. A. Hall-Craggs (1996). "Cranial MR imaging in Wilson's disease." *AJR Am J Roentgenol* **167**(6): 1579-1584.

Klopstock, T., F. Tricta, L. Neumayr, I. Karin, G. Zorzi, C. Fradette, T. Kmiec, B. Buchner, H. E. Steele, R. Horvath, P. F. Chinnery, A. Basu, C. Kupper, C. Neuhofer, B. Kalman, P. Dusek, Z. Yapici, I. Wilson, F. Zhao, F. Zibordi, N. Nardocci, C. Aguilar, S. J. Hayflick, M. Spino, A. M. Blamire, P. Hogarth and E. Vichinsky (2019). "Safety and efficacy of deferiprone for pantothenate kinase-associated neurodegeneration: a randomised, double-blind, controlled trial and an open-label extension study." *Lancet Neurol* **18**(7): 631-642.

Knopfel, M., L. Zhao and M. D. Garrick (2005). "Transport of divalent transition-metal ions is lost in small-intestinal tissue of b/b Belgrade rats." *Biochemistry* **44**(9): 3454-3465.

Koga, S., N. Kouri, R. L. Walton, M. T. W. Ebbert, K. A. Josephs, I. Litvan, N. Graff-Radford, J. E. Ahlskog, R. J. Uitti, J. A. van Gerpen, B. F. Boeve, A. Parks, O. A. Ross and D. W. Dickson (2018). "Corticobasal degeneration with TDP-43 pathology presenting with progressive supranuclear palsy syndrome: a distinct clinicopathologic subtype." *Acta Neuropathol* **136**(3): 389-404.

Kostial, K., D. Kello, S. Jugo, I. Rabar and T. Maljkovic (1978). "Influence of age on metal metabolism and toxicity." *Environ Health Perspect* **25**: 81-86.

Krieger, D., S. Krieger, O. Jansen, P. Gass, L. Theilmann and H. Lichtnecker (1995). "Manganese and chronic hepatic encephalopathy." *Lancet* **346**(8970): 270-274.

Krogias, C., J. Eyding and T. Postert (2010). "Transcranial sonography in Huntington's disease." *Int Rev Neurobiol* **90**: 237-257.

Krogias, C., K. Strassburger, J. Eyding, R. Gold, C. Norra, G. Juckel, C. Saft and D. Niphuis (2011). "Depression in patients with Huntington disease correlates with alterations of the brain stem raphe depicted by transcranial sonography." *J Psychiatry Neurosci* **36**(3): 187-194.

Kubota, A., A. Hida, Y. Ichikawa, Y. Momose, J. Goto, Y. Igeta, H. Hashida, K. Yoshida, S. Ikeda, I. Kanazawa and S. Tsuji (2009). "A novel ferritin light chain gene mutation in a Japanese family with neuroferritinopathy: description of clinical features and implications for genotype-phenotype correlations." *Mov Disord* **24**(3): 441-445.

Kumar, A., A. Singh and Ekavali (2015). "A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update." *Pharmacol Rep* **67**(2): 195-203.

Kumar, K. R., K. Lohmann and C. Klein (2012). "Genetics of Parkinson disease and other movement disorders." *Curr Opin Neurol* **25**(4): 466-474.

Kumar, N., P. Rizek and M. Jog (2016). "Neuroferritinopathy: Pathophysiology, Presentation, Differential Diagnoses and Management." *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* **6**: 355.

Lafaye, P., I. Achour, P. England, C. Duyckaerts and F. Rougeon (2009). "Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent Abeta-induced neurotoxicity and inhibit fibril formation." *Mol Immunol* **46**(4): 695-704.

Lagana, M. M., L. Forzoni, S. Viotti, S. De Beni, G. Baselli and P. Cecconi (2011). "Assessment of the cerebral venous system from the transcondylar ultrasound window using virtual navigator technology and MRI." *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2011**: 579-582.

Lakatos, B., K. Szentmihalyi, P. Vinkler, J. Balla and G. Balla (2004). "[The role of essential metal ions in the human organism and their oral supplementation to the human body in deficiency states]." *Orv Hetil* **145**(25): 1315-1319.

Langkammer, C., N. Krebs, W. Goessler, E. Scheurer, F. Ebner, K. Yen, F. Fazekas and S. Ropele (2010). "Quantitative MR imaging of brain iron: a postmortem validation study." *Radiology* **257**(2): 455-462.

Lauren, J., D. A. Gimbel, H. B. Nygaard, J. W. Gilbert and S. M. Strittmatter (2009). "Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers." *Nature* **457**(7233): 1128-1132.

Lee, J. A. (2009). "Autophagy in neurodegeneration: two sides of the same coin." *BMB Rep* **42**(6): 324-330.

Lee, J. H. and S. K. Baik (2011). "Putaminal hypointensity in the parkinsonian variant of multiple system atrophy: simple visual assessment using susceptibility-weighted imaging." *J Mov Disord* **4**(2): 60-63.

Lee, J. H., Y. H. Han, J. W. Cho, J. S. Lee, S. J. Lee, D. J. Kim, T. H. Kim, B. M. Kang, T. H. Kim and C. W. Mun (2014). "Evaluation of brain iron content in idiopathic REM sleep behavior disorder using quantitative magnetic resonance imaging." *Parkinsonism Relat Disord* **20**(7): 776-778.

Lechpammer, M., M. S. Clegg, Z. Muzar, P. A. Huebner, L. W. Jin and S. M. Gospe, Jr. (2014). "Pathology of inherited manganese transporter deficiency." *Ann Neurol* **75**(4): 608-612.

Leinweber, B., J. C. Moller, A. Scherag, U. Reuner, P. Gunther, C. J. Lang, H. H. Schmidt, C. Schrader, O. Bandmann, A. Czlonkowska, W. H. Oertel and H. Hefter (2008). "Evaluation of the Unified Wilson's Disease Rating Scale (UWDRS) in German patients with treated Wilson's disease." *Mov Disord* **23**(1): 54-62.

Levi, S. and D. Finazzi (2014). "Neurodegeneration with brain iron accumulation: update on pathogenic mechanisms." *Front Pharmacol* **5**: 99.

Levi, S. and E. Rovida (2015). "Neuroferritinopathy: From ferritin structure modification to pathogenetic mechanism." *Neurobiol Dis* **81**: 134-143.

Lewinska-Preis, L., M. Jablonska, M. J. Fabianska and A. Kita (2011). "Bioelements and mineral matter in human livers from the highly industrialized region of the Upper Silesia Coal Basin (Poland)." *Environ Geochem Health* **33**(6): 595-611.

Li, D. H., Y. C. He, J. Liu and S. D. Chen (2016). "Diagnostic Accuracy of Transcranial Sonography of the Substantia Nigra in Parkinson's disease: A Systematic Review and Meta-analysis." *Sci Rep* **6**: 20863.

Li, J., F. Cao, H. L. Yin, Z. J. Huang, Z. T. Lin, N. Mao, B. Sun and G. Wang (2020). "Ferroptosis: past, present and future." *Cell Death Dis* **11**(2): 88.

Lieberman, A. P., V. G. Shakkottai and R. L. Albin (2019). "Polyglutamine Repeats in Neurodegenerative Diseases." *Annu Rev Pathol* **14**: 1-27.

Lim, Y. M., H. K. Park, J. S. Kim, C. S. Lee, S. J. Chung, J. Kim and K. K. Kim (2013). "Clinical and neuroimaging characteristics in neurodegenerative overlap syndrome." *Neurol Sci* **34**(6): 875-881.

Lippens, G., A. Sillen, I. Landrieu, L. Amniai, N. Sibille, P. Barbier, A. Leroy, X. Hanouille and J. M. Wieruszeski (2007). "Tau aggregation in Alzheimer's disease: what role for phosphorylation?" *Prion* **1**(1): 21-25.

Litwin, T., G. Gromadzka, A. Czlonkowska, M. Golebiowski and R. Poniatowska (2013). "The effect of gender on brain MRI pathology in Wilson's disease." *Metab Brain Dis* **28**(1): 69-75.

Litwin, T., G. Gromadzka, G. M. Szpak, K. Jablonka-Salach, E. Bulska and A. Czlonkowska (2013). "Brain metal accumulation in Wilson's disease." *J Neurol Sci* **329**(1-2): 55-58.

Liu, S., S. Buch, Y. Chen, H. S. Choi, Y. Dai, C. Habib, J. Hu, J. Y. Jung, Y. Luo, D. Utriainen, M. Wang, D. Wu, S. Xia and E. M. Haacke (2017). "Susceptibility-weighted imaging: current status and future directions." *NMR Biomed* **30**(4).

Liu, Y., X. Y. Zhu, X. J. Zhang, S. H. Kuo, W. G. Ondo and Y. C. Wu (2017). "Clinical features of Parkinson's disease with and without rapid eye movement sleep behavior disorder." *Transl Neurodegener* **6**: 35.

Liu, Z., Z. Ren, J. Zhang, C. C. Chuang, E. Kandaswamy, T. Zhou and L. Zuo (2018). "Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases." *Front Physiol* **9**: 477.

Lopin, K. V., I. P. Gray, C. A. Obejero-Paz, F. Thevenod and S. W. Jones (2012). "Fe(2)(+) block and permeation of CaV3.1 (alpha1G) T-type calcium channels: candidate mechanism for non-transferrin-mediated Fe(2)(+) influx." *Mol Pharmacol* **82**(6): 1194-1204.

Love, S. (2004). "Post mortem sampling of the brain and other tissues in neurodegenerative disease." *Histopathology* **44**(4): 309-317.

Lovell, M. A., J. D. Robertson, W. J. Teesdale, J. L. Campbell and W. R. Markesbery (1998). "Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques." *J Neurol Sci* **158**(1): 47-52.

Lumsden, A. L., J. T. Rogers, S. Majd, M. Newman, G. T. Sutherland, G. Verdile and M. Lardelli (2018). "Dysregulation of Neuronal Iron Homeostasis as an Alternative Unifying Effect of Mutations Causing Familial Alzheimer's Disease." *Front Neurosci* **12**: 533.

Lynch, M. A. (2010). "Age-related neuroinflammatory changes negatively impact on neuronal function." *Front Aging Neurosci* **1**: 6.

Lynch, T. and A. A. Sima (1996). "Glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy." *Ann Neurol* **39**(3): 416.

Magalhaes, A. C., P. Caramelli, J. R. Menezes, L. S. Lo, L. A. Bacheschi, E. R. Barbosa, L. A. Rosemberg and A. Magalhaes (1994). "Wilson's disease: MRI with clinical correlation." *Neuroradiology* **36**(2): 97-100.

Mahlknecht, P., A. Hotter, A. Hussl, R. Esterhammer, M. Schocke and K. Seppi (2010). "Significance of MRI in diagnosis and differential diagnosis of Parkinson's disease." *Neurodegener Dis* **7**(5): 300-318.

Mancuso, M., V. Calsolaro, D. Orsucci, G. Siciliano and L. Murri (2009). "Is there a primary role of the mitochondrial genome in Alzheimer's disease?" *J Bioenerg Biomembr* **41**(5): 411-416.

Mancuso, M., G. Davidzon, R. M. Kurlan, R. Tawil, E. Bonilla, S. Di Mauro and J. M. Powers (2005). "Hereditary ferritinopathy: a novel mutation, its cellular pathology, and pathogenetic insights." *J Neuropathol Exp Neurol* **64**(4): 280-294.

Mann, D. M. and D. Jones (1990). "Deposition of amyloid (A4) protein within the brains of persons with dementing disorders other than Alzheimer's disease and Down's syndrome." *Neurosci Lett* **109**(1-2): 68-75.

Maor-Nof, M., E. Romi, H. Sar Shalom, V. Ullisse, C. Raanan, A. Nof, D. Leshkowitz, R. Lang and A. Yaron (2016). "Axonal Degeneration Is Regulated by a Transcriptional Program that Coordinates Expression of Pro- and Anti-degenerative Factors." *Neuron* **92**(5): 991-1006.

Marchi, G., F. Busti, A. Lira Zidanes, A. Castagna and D. Girelli (2019). "Aceruloplasminemia: A Severe Neurodegenerative Disorder Deserving an Early Diagnosis." *Front Neurosci* **13**: 325.

Martinet, W., P. Agostinis, B. Vanhoecke, M. Dewaele and G. R. De Meyer (2009). "Autophagy in disease: a double-edged sword with therapeutic potential." *Clin Sci (Lond)* **116**(9): 697-712.

Martinez-Fernandez, R., N. Caballol and M. Gomez-Choco (2013). "MRI and transcranial sonography findings in Wilson's disease." *Mov Disord* **28**(6): 740.

Maskova, J., D. Skoloudik, A. Burgetova, O. Fiala, R. Bruha, D. Zahorakova, T. Serranova, M. Slovak, O. Ulmanova, E. Ruzicka and P. Dusek (2016). "Comparison of transcranial sonography-magnetic resonance fusion imaging in Wilson's and early-onset Parkinson's diseases." *Parkinsonism Relat Disord* **28**: 87-93.

Mazza, S., J. P. Soucy, P. Gravel, M. Michaud, R. Postuma, J. Massicotte-Marquez, A. Decary and J. Montplaisir (2006). "Assessing whole brain perfusion changes in patients with REM sleep behavior disorder." *Neurology* **67**(9): 1618-1622.

McCarthy, R. C. and D. J. Kosman (2015). "Iron transport across the blood-brain barrier: development, neurovascular regulation and cerebral amyloid angiopathy." *Cell Mol Life Sci* **72**(4): 709-727.

McCarthy, R. C., J. C. Sosa, A. M. Gardeck, A. S. Baez, C. H. Lee and M. Wessling-Resnick (2018). "Inflammation-induced iron transport and metabolism by brain microglia." *J Biol Chem* **293**(20): 7853-7863.

McColgan, P. and S. J. Tabrizi (2018). "Huntington's disease: a clinical review." *Eur J Neurol* **25**(1): 24-34.

McFarland, N. R. (2016). "Diagnostic Approach to Atypical Parkinsonian Syndromes." *Continuum (Minneapolis)* **22**(4 Movement Disorders): 1117-1142.

McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2008). "Glial reactions in Parkinson's disease." *Mov Disord* **23**(4): 474-483.

McKeith, I. G., B. F. Boeve, D. W. Dickson, G. Halliday, J. P. Taylor, D. Weintraub, D. Aarsland, J. Galvin, J. Attems, C. G. Ballard, A. Bayston, T. G. Beach, F. Blanc, N. Bohnen, L. Bonanni, J. Bras, P. Brundin, D. Burn, A. Chen-Plotkin, J. E. Duda, O. El-Agnaf, H. Feldman, T. J. Ferman, D. Ffytche, H. Fujishiro, D. Galasko, J. G. Goldman, S. N. Gomperts, N. R. Graff-Radford, L. S. Honig, A. Iranzo, K. Kantarci, D. Kaufer, W. Kukull, V. M. Y. Lee, J. B. Leverenz, S. Lewis, C. Lippa, A. Lunde, M. Masellis, E. Masliah, P. McLean, B. Mollenhauer, T. J. Montine, E. Moreno, E. Mori, M. Murray, J. T. O'Brien, S. Orimo, R. B. Postuma, S. Ramaswamy, O. A. Ross, D. P.

Salmon, A. Singleton, A. Taylor, A. Thomas, P. Tiraboschi, J. B. Toledo, J. Q. Trojanowski, D. Tsuang, Z. Walker, M. Yamada and K. Kosaka (2017). "Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium." *Neurology* **89**(1): 88-100.

Meade, R. M., D. P. Fairlie and J. M. Mason (2019). "Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease - lessons and emerging principles." *Mol Neurodegener* **14**(1): 29.

Meade, T. W. (1975). "Subacute myelo-optic neuropathy and clioquinol. An epidemiological case-history for diagnosis." *Br J Prev Soc Med* **29**(3): 157-169.

Meenakshi-Sundaram, S., A. Mahadevan, A. B. Taly, G. R. Arunodaya, H. S. Swamy and S. K. Shankar (2008). "Wilson's disease: a clinico-neuropathological autopsy study." *J Clin Neurosci* **15**(4): 409-417.

Meijer, F. J., A. van Rumund, B. A. Fasen, I. Titulaer, M. Aerts, R. Esselink, B. R. Bloem, M. M. Verbeek and B. Goraj (2015). "Susceptibility-weighted imaging improves the diagnostic accuracy of 3T brain MRI in the work-up of parkinsonism." *AJNR Am J Neuroradiol* **36**(3): 454-460.

Meijer, F. J., A. van Rumund, A. M. Tuladhar, M. B. Aerts, I. Titulaer, R. A. Esselink, B. R. Bloem, M. M. Verbeek and B. Goraj (2015). "Conventional 3T brain MRI and diffusion tensor imaging in the diagnostic workup of early stage parkinsonism." *Neuroradiology* **57**(7): 655-669.

Meyer, E., M. A. Kurian and S. J. Hayflick (2015). "Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation: Genetic Diversity and Pathophysiological Mechanisms." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **16**: 257-279.

Meziane, H., J. C. Dodart, C. Mathis, S. Little, J. Clemens, S. M. Paul and A. Ungerer (1998). "Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12683-12688.

Mijajlovic, M. D. (2010). "Transcranial sonography in depression." *Int Rev Neurobiol* **90**: 259-272.

Millecamps, S. and J. P. Julien (2013). "Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases." *Nat Rev Neurosci* **14**(3): 161-176.

Millerot, E., A. S. Prigent-Tessier, N. M. Bertrand, P. J. Faure, C. M. Mossiat, M. E. Giroud, A. G. Beley and C. Marie (2005). "Serum ferritin in stroke: a marker of increased body iron stores or stroke severity?" *J Cereb Blood Flow Metab* **25**(10): 1386-1393.

Miyajima, H., Y. Takahashi, T. Kamata, H. Shimizu, N. Sakai and J. D. Gitlin (1997). "Use of desferrioxamine in the treatment of aceruloplasminemia." *Ann Neurol* **41**(3): 404-407.

Miyamoto, M. and T. Miyamoto (2013). "Neuroimaging of rapid eye movement sleep behavior disorder: transcranial ultrasound, single-photon emission computed tomography, and positron emission tomography scan data." *Sleep Med* **14**(8): 739-743.

Mizuno, D. and M. Kawahara (2013). "The molecular mechanisms of zinc neurotoxicity and the pathogenesis of vascular type senile dementia." *Int J Mol Sci* **14**(11): 22067-22081.

Mocchegiani, E., C. Bertoni-Freddari, F. Marcellini and M. Malavolta (2005). "Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability." *Prog Neurobiol* **75**(6): 367-390.

Molina, J. A., F. J. Jimenez-Jimenez, M. V. Aguilar, I. Meseguer, C. J. Mateos-Vega, M. J. Gonzalez-Munoz, F. de Bustos, J. Porta, M. Orti-Pareja, M. Zurdo, E. Barrios and M. C. Martinez-Para (1998). "Cerebrospinal fluid levels of transition metals in patients with Alzheimer's disease." *J Neural Transm (Vienna)* **105**(4-5): 479-488.

Monnot, A. D., M. Behl, S. Ho and W. Zheng (2011). "Regulation of brain copper homeostasis by the brain barrier systems: effects of Fe-overload and Fe-deficiency." *Toxicol Appl Pharmacol* **256**(3): 249-257.

Morita, H., S. Ikeda, K. Yamamoto, S. Morita, K. Yoshida, S. Nomoto, M. Kato and N. Yanagisawa (1995). "Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: a clinicopathological study of a Japanese family." *Ann Neurol* **37**(5): 646-656.

Motonishi, S., H. Hayashi, Y. Fujita, H. Okada, A. Kusakabe, M. Ito, K. Miyamoto and T. Ueno (2006). "Copper- and iron-rich matrices in hepatocellular lipofuscin particles of a young male patient: diagnostic ultrastructures for Wilson disease." *Ultrastruct Pathol* **30**(6): 409-414.

Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochem J* **417**(1): 1-13.

Myers, S. A., A. Nield and M. Myers (2012). "Zinc transporters, mechanisms of action and therapeutic utility: implications for type 2 diabetes mellitus." *J Nutr Metab* **2012**: 173712.

Naka, H., T. Ohshita, Y. Murata, Y. Imon, Y. Mimori and S. Nakamura (2002). "Characteristic MRI findings in multiple system atrophy: comparison of the three subtypes." *Neuroradiology* **44**(3): 204-209.

Nance, M. A. and R. H. Myers (2001). "Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research perspectives." *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **7**(3): 153-157.

Naumann, M., G. Becker, K. V. Toyka, T. Supprian and K. Reiners (1996). "Lenticular nucleus lesion in idiopathic dystonia detected by transcranial sonography." *Neurology* **47**(5): 1284-1290.

Newland, M. C., T. L. Ceckler, J. H. Kordower and B. Weiss (1989). "Visualizing manganese in the primate basal ganglia with magnetic resonance imaging." *Exp Neurol* **106**(3): 251-258.

Niu, L., C. Ye, Y. Sun, T. Peng, S. Yang, W. Wang and H. Li (2018). "Mutant huntingtin induces iron overload via up-regulating IRP1 in Huntington's disease." *Cell Biosci* **8**: 41.

Nnah, I. C. and M. Wessling-Resnick (2018). "Brain Iron Homeostasis: A Focus on Microglial Iron." *Pharmaceuticals (Basel)* **11**(4).

Noyce, A. J., J. Dickson, R. N. Rees, J. P. Bestwick, I. U. Isaias, M. Politis, G. Giovannoni, T. T. Warner, A. J. Lees and A. Schrag (2018). "Dopamine reuptake transporter-single-photon emission computed tomography and transcranial sonography as imaging markers of pre-diagnostic Parkinson's disease." *Mov Disord* **33**(3): 478-482.

Nuzzo, S., C. Meneghini, S. Mobilio, H. Haas, P. Riccio, A. Fasano, P. Cavatorta and S. Morante (2002). "An x-ray absorption spectroscopy study of the zinc environment in Langmuir-Blodgett phospholipid multilayers." *Biophys J* **83**(6): 3507-3512.

Oestreicher, E., G. J. Sengstock, P. Riederer, C. W. Olanow, A. J. Dunn and G. W. Arendash (1994). "Degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons increases iron within the substantia nigra: a histochemical and neurochemical study." *Brain Res* **660**(1): 8-18.

Olivieri, N. F., G. M. Brittenham, C. E. McLaren, D. M. Templeton, R. G. Cameron, R. A. McClelland, A. D. Burt and K. A. Fleming (1998). "Long-term safety and effectiveness of iron-chelation therapy with deferiprone for thalassemia major." *N Engl J Med* **339**(7): 417-423.

Opazo, C., M. I. Barria, F. H. Ruiz and N. C. Inestrosa (2003). "Copper reduction by copper binding proteins and its relation to neurodegenerative diseases." *Biometals* **16**(1): 91-98.

Osaki, S., D. A. Johnson and E. Frieden (1971). "The mobilization of iron from the perfused mammalian liver by a serum copper enzyme, ferroxidase I." *J Biol Chem* **246**(9): 3018-3023.

Ostergaard, S. D., S. Mukherjee, S. J. Sharp, P. Proitsi, L. A. Lotta, F. Day, J. R. Perry, K. L. Boehme, S. Walter, J. S. Kauwe, L. E. Gibbons, C. Alzheimer's Disease Genetics, G. Consortium, E. P.-I. Consortium, E. B. Larson, J. F. Powell, C. Langenberg, P. K. Crane, N. J. Wareham and R. A. Scott (2015). "Associations between Potentially Modifiable Risk Factors and Alzheimer Disease: A Mendelian Randomization Study." *PLoS Med* **12**(6): e1001841; discussion e1001841.

Ott, P., O. Clemmesen and F. S. Larsen (2005). "Cerebral metabolic disturbances in the brain during acute liver failure: from hyperammonemia to energy failure and proteolysis." *Neurochem Int* **47**(1-2): 13-18.

Ouchi, Y., E. Yoshikawa, Y. Sekine, M. Futatsubashi, T. Kanno, T. Ogusu and T. Torizuka (2005). "Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease." *Ann Neurol* **57**(2): 168-175.

Ozawa, T. and O. Onodera (2017). "Multiple system atrophy: clinicopathological characteristics in Japanese patients." *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **93**(5): 251-258.

Ozawa, T., K. Sekiya, N. Aizawa, K. Terajima and M. Nishizawa (2016). "Laryngeal stridor in multiple system atrophy: Clinicopathological features and causal hypotheses." *J Neurol Sci* **361**: 243-249.

Paleologou, K. E., C. L. Kragh, D. M. Mann, S. A. Salem, R. Al-Shami, D. Allsop, A. H. Hassan, P. H. Jensen and O. M. El-Agnaf (2009). "Detection of elevated levels of soluble alpha-synuclein oligomers in post-mortem brain extracts from patients with dementia with Lewy bodies." *Brain* **132**(Pt 4): 1093-1101.

Palumaa, P. (2013). "Copper chaperones. The concept of conformational control in the metabolism of copper." *FEBS Lett* **587**(13): 1902-1910.

Pamphlett, R., D. P. Bishop, S. Kum Jew and P. A. Doble (2018). "Age-related accumulation of toxic metals in the human locus ceruleus." *PLoS One* **13**(9): e0203627.

Pan, P. L., H. H. Tang, Q. Chen, W. Song and H. F. Shang (2011). "Desferrioxamine treatment of aceruloplasminemia: Long-term follow-up." *Mov Disord* **26**(11): 2142-2144.

Pandey, R. S., K. N. Sreenivas, N. M. Patil and H. S. Swamy (1981). "Dopamine beta-hydroxylase inhibition in a patient with Wilson's disease and manic symptoms." *Am J Psychiatry* **138**(12): 1628-1629.

Parmara, J. B., R. D. Rodriguez, A. Studart Neto, R. Nitrini and S. M. D. Brucki (2016). "Corticobasal syndrome: A diagnostic conundrum." *Dement Neuropsychol* **10**(4): 267-275.

Pelizzoni, I., R. Macco, M. F. Morini, D. Zacchetti, F. Grohovaz and F. Codazzi (2011). "Iron handling in hippocampal neurons: activity-dependent iron entry and mitochondria-mediated neurotoxicity." *Aging Cell* **10**(1): 172-183.

Pelizzoni, I., D. Zacchetti, A. Campanella, F. Grohovaz and F. Codazzi (2013). "Iron uptake in quiescent and inflammation-activated astrocytes: a potentially neuroprotective control of iron burden." *Biochim Biophys Acta* **1832**(8): 1326-1333.

Penkowa, M. and J. Hidalgo (2001). "Metallothionein treatment reduces proinflammatory cytokines IL-6 and TNF-alpha and apoptotic cell death during experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." *Exp Neurol* **170**(1): 1-14.

Pichler, I., M. F. Del Greco, M. Gogele, C. M. Lill, L. Bertram, C. B. Do, N. Eriksson, T. Foroud, R. H. Myers, P. G. Consortium, M. Nalls, M. F. Keller, C. International Parkinson's Disease Genomics, C. Wellcome Trust Case Control, B. Benyamin, J. B. Whitfield, C. Genetics of Iron Status, P. P. Pramstaller, A. A. Hicks, J. R. Thompson and C. Minelli (2013). "Serum iron levels and the risk of Parkinson disease: a Mendelian randomization study." *PLoS Med* **10**(6): e1001462.

Piperno, A. and M. Alessio (2018). "Aceruloplasminemia: Waiting for an Efficient Therapy." *Front Neurosci* **12**: 903.

Poewe, W., K. Seppi, C. M. Tanner, G. M. Halliday, P. Brundin, J. Volkman, A. E. Schrag and A. E. Lang (2017). "Parkinson disease." *Nat Rev Dis Primers* **3**: 17013.

Portbury, S. D. and P. A. Adlard (2017). "Zinc Signal in Brain Diseases." *Int J Mol Sci* **18**(12).

Postuma, R. B. (2014). "Prodromal Parkinson's disease--using REM sleep behavior disorder as a window." *Parkinsonism Relat Disord* **20** Suppl 1: S1-4.

Postuma, R. B. (2019). "Prodromal Parkinson disease: do we miss the signs?" *Nat Rev Neurol* **15**(8): 437-438.

Postuma, R. B., D. Berg, M. Stern, W. Poewe, C. W. Olanow, W. Oertel, J. Obeso, K. Marek, I. Litvan, A. E. Lang, G. Halliday, C. G. Goetz, T. Gasser, B. Dubois, P. Chan, B. R. Bloem, C. H. Adler and G. Deuschl (2015). "MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease." *Mov Disord* **30**(12): 1591-1601.

Postuma, R. B., J. F. Gagnon and J. Y. Montplaisir (2013). "REM Sleep Behavior Disorder and Prodromal Neurodegeneration - Where Are We Headed?" *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* **3**.

Postuma, R. B., A. Iranzo, M. Hu, B. Hogl, B. F. Boeve, R. Manni, W. H. Oertel, I. Arnulf, L. Ferini-Strambi, M. Puligheddu, E. Antelmi, V. Cochen De Cock, D. Arnaldi, B. Mollenhauer, A. Videnovic, K. Sonka, K. Y. Jung, D. Kunz, Y. Dauvilliers, F. Provini, S. J. Lewis, J. Buskova, M. Pavlova, A. Heidebreder, J. Y. Montplaisir, J. Santamaria, T. R. Barber, A. Stefani, E. K. St Louis, M. Terzaghi, A. Janzen, S. Leu-Semenescu, G. Plazzi, F. Nobili, F. Sixel-Doering, P. Dusek, F. Bes, P. Cortelli, K. Ehgoetz Martens, J. F. Gagnon, C. Gaig, M. Zucconi, C. Trenkwalder, Z. Gan-Or, C. Lo, M. Rolinski, P. Mahlknecht, E. Holzknacht, A. R. Boeve, L. N. Teigen, G. Toscano, G. Mayer, S. Morbelli, B. Dawson and A. Pelletier (2019). "Risk and predictors of dementia and parkinsonism in idiopathic REM sleep behaviour disorder: a multicentre study." *Brain* **142**(3): 744-759.

Postuma, R. B. and J. Montplaisir (2010). "Transcranial ultrasound and olfaction in REM sleep behavior disorder: testing predictors of Parkinson's disease." *Sleep Med* **11**(4): 339-340.

Postuma, R. B., W. Poewe, I. Litvan, S. Lewis, A. E. Lang, G. Halliday, C. G. Goetz, P. Chan, E. Slow, K. Seppi, E. Schaffer, S. Rios-Romenets, T. Mi, C. Maetzler, Y. Li, B. Heim, I. O. Bledsoe and D. Berg (2018). "Validation of the MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease." *Mov Disord* **33**(10): 1601-1608.

Potocnik, F. C., S. J. van Rensburg, C. Park, J. J. Taljaard and R. A. Emsley (1997). "Zinc and platelet membrane microviscosity in Alzheimer's disease. The in vivo effect of zinc on platelet membranes and cognition." *S Afr Med J* **87**(9): 1116-1119.

Prayer, L., D. Wimberger, J. Kramer, G. Grimm, W. Oder and H. Imhof (1990). "Cranial MRI in Wilson's disease." *Neuroradiology* **32**(3): 211-214.

Price, J. L., P. B. Davis, J. C. Morris and D. L. White (1991). "The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **12**(4): 295-312.

Pringsheim, T., K. Wiltshire, L. Day, J. Dykeman, T. Steeves and N. Jette (2012). "The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis." *Mov Disord* **27**(9): 1083-1091.

Prodoehl, J., P. J. Planetta, A. S. Kurani, C. L. Comella, D. M. Corcos and D. E. Vaillancourt (2013). "Differences in brain activation between tremor- and nontremor-dominant Parkinson disease." *JAMA Neurol* **70**(1): 100-106.

Prohaska, J. R. (2008). "Role of copper transporters in copper homeostasis." *Am J Clin Nutr* **88**(3): 826S-829S.

Pyatigorskaya, N., R. Gaurav, D. Arnaldi, S. Leu-Semenescu, L. Yahia-Cherif, R. Valabregue, M. Vidailhet, I. Arnulf and S. Lehericy (2017). "Magnetic Resonance Imaging Biomarkers to Assess Substantia Nigra Damage in Idiopathic Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder." *Sleep* **40**(11).

Qian, Z. M. and Y. Ke (2019). "Brain iron transport." *Biol Rev Camb Philos Soc* **94**(5): 1672-1684.

Qian, Z. M. and X. Shen (2001). "Brain iron transport and neurodegeneration." *Trends Mol Med* **7**(3): 103-108.

Quadri, M., A. Federico, T. Zhao, G. J. Breedveld, C. Battisti, C. Delnooz, L. A. Severijnen, L. Di Toro Mammarella, A. Mignarri, L. Monti, A. Sanna, P. Lu, F. Punzo, G. Cossu, R. Willemsen, F. Rasi, B. A. Oostra, B. P. van de Warrenburg and V. Bonifati (2012). "Mutations in SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia, and chronic liver disease." *Am J Hum Genet* **90**(3): 467-477.

Quintanilla, R. A. and G. V. Johnson (2009). "Role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Huntington's disease." *Brain Res Bull* **80**(4-5): 242-247.

Rae, T. D., P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta and T. V. O'Halloran (1999). "Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase." *Science* **284**(5415): 805-808.

Rahayel, S., J. Montplaisir, O. Monchi, C. Bedetti, R. B. Postuma, S. Brambati, J. Carrier, S. Joubert, V. Latreille, T. Jubault and J. F. Gagnon (2015). "Patterns of cortical thinning in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder." *Mov Disord* **30**(5): 680-687.

Rana, A. Q., U. S. Ahmed, Z. M. Chaudry and S. Vasan (2015). "Parkinson's disease: a review of non-motor symptoms." *Expert Rev Neurother* **15**(5): 549-562.

Reinert, A., M. Morawski, J. Seeger, T. Arendt and T. Reinert (2019). "Iron concentrations in neurons and glial cells with estimates on ferritin concentrations." *BMC Neurosci* **20**(1): 25.

Ren, P. H., J. E. Lauckner, I. Kachirskaia, J. E. Heuser, R. Melki and R. R. Kopito (2009). "Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates." *Nat Cell Biol* **11**(2): 219-225.

Rezaei-Ghaleh, N., K. Giller, S. Becker and M. Zweckstetter (2011). "Effect of zinc binding on beta-amyloid structure and dynamics: implications for A β aggregation." *Biophys J* **101**(5): 1202-1211.

Ricciardi, M. C., G. Sirimarco, E. Vicenzini, C. Zucco, G. Meco, V. Di Piero and G. L. Lenzi (2010). "Transcranial sonographic findings in Wilson disease." *J Ultrasound Med* **29**(7): 1143-1145.

Riederer, P., E. Sofic, W. D. Rausch, B. Schmidt, G. P. Reynolds, K. Jellinger and M. B. Youdim (1989). "Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains." *J Neurochem* **52**(2): 515-520.

Rihel, J. (2018). "Copper on the brain." *Nat Chem Biol* **14**(7): 638-639.

Rizzo, A. M., P. Berselli, S. Zava, G. Montorfano, M. Negroni, P. Corsetto and B. Berra (2010). "Endogenous antioxidants and radical scavengers." *Adv Exp Med Biol* **698**: 52-67.

Roberti Mdo, R., H. M. Borges Filho, C. H. Goncalves and F. L. Lima (2011). "Aceruloplasminemia: a rare disease - diagnosis and treatment of two cases." *Rev Bras Hematol Hemoter* **33**(5): 389-392.

Roberts, E. A., M. L. Schilsky and D. American Association for Study of Liver (2008). "Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update." *Hepatology* **47**(6): 2089-2111.

Rodriguez-Castro, K. I., F. J. Hevia-Urrutia and G. C. Sturniolo (2015). "Wilson's disease: A review of what we have learned." *World J Hepatol* **7**(29): 2859-2870.

Rodriguez-Martin, T., I. Cuchillo-Ibanez, W. Noble, F. Nyenya, B. H. Anderton and D. P. Hanger (2013). "Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation." *Neurobiol Aging* **34**(9): 2146-2157.

Roh, J. K., T. G. Lee, B. A. Wie, S. B. Lee, S. H. Park and K. H. Chang (1994). "Initial and follow-up brain MRI findings and correlation with the clinical course in Wilson's disease." *Neurology* **44**(6): 1064-1068.

Romenets, S. R., J. F. Gagnon, V. Latreille, M. Panniset, S. Chouinard, J. Montplaisir and R. B. Postuma (2012). "Rapid eye movement sleep behavior disorder and subtypes of Parkinson's disease." *Mov Disord* **27**(8): 996-1003.

Roos, R. A. (2010). "Huntington's disease: a clinical review." *Orphanet J Rare Dis* **5**: 40.

Rottkamp, C. A., A. K. Raina, X. Zhu, E. Gaier, A. I. Bush, C. S. Atwood, M. Chevion, G. Perry and M. A. Smith (2001). "Redox-active iron mediates amyloid-beta toxicity." *Free Radic Biol Med* **30**(4): 447-450.

Sadowski, K., K. Szlachta, M. Serafin-Krol, J. Galazka-Friedman and A. Friedman (2012). "Brain tissue echogenicity-implications for substantia nigra studies in parkinsonian patients." *J Neural Transm (Vienna)* **119**(3): 363-367.

Sako, W., N. Murakami, Y. Izumi and R. Kaji (2014). "The difference in putamen volume between MSA and PD: evidence from a meta-analysis." *Parkinsonism Relat Disord* **20**(8): 873-877.

Salawu, F. K., A. Danburam and A. B. Olokoba (2010). "Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management." *Niger J Med* **19**(2): 126-131.

Salazar, J., N. Mena, S. Hunot, A. Prigent, D. Alvarez-Fischer, M. Arredondo, C. Duyckaerts, V. Sazdovitch, L. Zhao, L. M. Garrick, M. T. Nunez, M. D. Garrick, R. Raisman-Vozari and E. C. Hirsch (2008). "Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(47): 18578-18583.

Saleh, C., G. Doms, C. Berthold and F. Hertel (2016). "Post-operative imaging in deep brain stimulation: A controversial issue." *Neuroradiol J* **29**(4): 244-249.

Salminen, A., J. Ojala, A. Kauppinen, K. Kaarniranta and T. Suuronen (2009). "Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid-beta oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors." *Prog Neurobiol* **87**(3): 181-194.

Salvador, G. A., R. M. Uranga and N. M. Giusto (2010). "Iron and mechanisms of neurotoxicity." *Int J Alzheimers Dis* **2011**: 720658.

Saranza, G. M., J. L. Whitwell, G. G. Kovacs and A. E. Lang (2019). "Corticobasal degeneration." *Int Rev Neurobiol* **149**: 87-136.

Sasaki, M., E. Shibata, K. Tohyama, J. Takahashi, K. Otsuka, K. Tsuchiya, S. Takahashi, S. Ehara, Y. Terayama and A. Sakai (2006). "Neuromelanin magnetic resonance imaging of locus ceruleus and substantia nigra in Parkinson's disease." *Neuroreport* **17**(11): 1215-1218.

Sastre, M., J. Walter and S. M. Gentleman (2008). "Interactions between APP secretases and inflammatory mediators." *J Neuroinflammation* **5**: 25.

Savoirdo, M., W. C. Halliday, N. Nardocci, L. Strada, L. D'Incerti, L. Angelini, V. Rumi and J. D. Tesoro-Tess (1993). "Hallervorden-Spatz disease: MR and pathologic findings." *AJNR Am J Neuroradiol* **14**(1): 155-162.

Selikhova, M., D. R. Williams, P. A. Kempster, J. L. Holton, T. Revesz and A. J. Lees (2009). "A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease." *Brain* **132**(Pt 11): 2947-2957.

Seppi, K. and W. Poewe (2010). "Brain magnetic resonance imaging techniques in the diagnosis of parkinsonian syndromes." *Neuroimaging Clin N Am* **20**(1): 29-55.

Sharp, P. (2004). "The molecular basis of copper and iron interactions." *Proc Nutr Soc* **63**(4): 563-569.

Shih, M. C., M. Q. Hoexter, L. A. Andrade and R. A. Bressan (2006). "Parkinson's disease and dopamine transporter neuroimaging: a critical review." *Sao Paulo Med J* **124**(3): 168-175.

Shin, H. Y., E. Y. Joo, S. T. Kim, H. J. Dhong and J. W. Cho (2013). "Comparison study of olfactory function and substantia nigra hyperechogenicity in idiopathic REM sleep behavior disorder, Parkinson's disease and normal control." *Neurol Sci* **34**(6): 935-940.

Shiono, Y., S. Wakusawa, H. Hayashi, T. Takikawa, M. Yano, T. Okada, H. Mabuchi, S. Kono and H. Miyajima (2001). "Iron accumulation in the liver of male patients with Wilson's disease." *Am J Gastroenterol* **96**(11): 3147-3151.

Shirakawa, S., N. Takeuchi, N. Uchimura, T. Ohyama, H. Maeda, T. Abe, M. Ishibashi, Y. Ohshima and H. Ohshima (2002). "Study of image findings in rapid eye movement sleep behavioural disorder." *Psychiatry Clin Neurosci* **56**(3): 291-292.

Schapira, A. H. V., K. R. Chaudhuri and P. Jenner (2017). "Non-motor features of Parkinson disease." *Nat Rev Neurosci* **18**(8): 509.

Scheiber, I. F., R. Bruha and P. Dusek (2017). "Pathogenesis of Wilson disease." *Handb Clin Neurol* **142**: 43-55.

Scherfler, C., B. Frauscher, M. Schocke, A. Iranzo, V. Gschliesser, K. Seppi, J. Santamaria, E. Tolosa, B. Hogl, W. Poewe and S. Group (2011). "White and gray matter abnormalities in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: a diffusion-tensor imaging and voxel-based morphometry study." *Ann Neurol* **69**(2): 400-407.

Schiess, M. C., H. Zheng, V. M. Soukup, J. G. Bonnen and H. J. Nauta (2000). "Parkinson's disease subtypes: clinical classification and ventricular cerebrospinal fluid analysis." *Parkinsonism Relat Disord* **6**(2): 69-76.

Schmidauer, C., M. Sojer, K. Seppi, H. Stockner, B. Hogl, B. Biedermann, E. Brandauer, C. M. Peralta, G. K. Wenning and W. Poewe (2005). "Transcranial ultrasound shows nigral hypoechogenicity in restless legs syndrome." *Ann Neurol* **58**(4): 630-634.

Schulte, J. and J. T. Littleton (2011). "The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology." *Curr Trends Neurol* **5**: 65-78.

Schulz, J. B., M. Skalej, D. Wedekind, A. R. Luft, M. Abele, K. Voigt, J. Dichgans and T. Klockgether (1999). "Magnetic resonance imaging-based volumetry differentiates idiopathic Parkinson's syndrome from multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy." *Ann Neurol* **45**(1): 65-74.

Schweitzer, K. J., R. Hilker, U. Walter, L. Burghaus and D. Berg (2006). "Substantia nigra hyperechogenicity as a marker of predisposition and slower progression in Parkinson's disease." *Mov Disord* **21**(1): 94-98.

Silhan, P., M. Jelinkova, U. Walter, J. Pavlov Prasko, R. Herzig, K. Langova and D. Skoloudik (2015). "Transcranial sonography of brainstem structures in panic disorder." *Psychiatry Res* **234**(1): 137-143.

Sinha, S., A. B. Taly, L. K. Prashanth, S. Ravishankar, G. R. Arunodaya and M. K. Vasudev (2007). "Sequential MRI changes in Wilson's disease with de-coppering therapy: a study of 50 patients." *Br J Radiol* **80**(957): 744-749.

Sinha, S., A. B. Taly, S. Ravishankar, L. K. Prashanth, K. S. Venugopal, G. R. Arunodaya, M. K. Vasudev and H. S. Swamy (2006). "Wilson's disease: cranial MRI observations and clinical correlation." *Neuroradiology* **48**(9): 613-621.

Skaper, S. D., L. Facci, M. Zusso and P. Giusti (2018). "An Inflammation-Centric View of Neurological Disease: Beyond the Neuron." *Front Cell Neurosci* **12**: 72.

Skoloudik, D., P. Bartova, J. Maskova, P. Dusek, J. Blahuta, K. Langova, U. Walter and R. Herzig (2016). "Transcranial Sonography of the Insula: Digitized Image Analysis of Fusion Images with Magnetic Resonance." *Ultraschall Med*.

Skoloudik, D., P. Bartova, J. Maskova, P. Dusek, J. Blahuta, K. Langova, U. Walter and R. Herzig (2016). "Transcranial Sonography of the Insula: Digitized Image Analysis of Fusion Images with Magnetic Resonance." *Ultraschall Med* **37**(6): 604-608.

Skoloudik, D., M. Jelinkova, J. Blahuta, P. Cermak, T. Soukup, P. Bartova, K. Langova and R. Herzig (2014). "Transcranial sonography of the substantia nigra: digital image analysis." *AJNR Am J Neuroradiol* **35**(12): 2273-2278.

Skoloudik, D. and U. Walter (2010). "Method and validity of transcranial sonography in movement disorders." *Int Rev Neurobiol* **90**: 7-34.

Snow, B. J., M. Bhatt, W. R. Martin, D. Li and D. B. Calne (1991). "The nigrostriatal dopaminergic pathway in Wilson's disease studied with positron emission tomography." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **54**(1): 12-17.

Sommerauer, M., T. D. Fedorova, A. K. Hansen, K. Knudsen, M. Otto, J. Jeppesen, Y. Frederiksen, J. U. Blicher, J. Geday, A. Nahimi, M. F. Damholdt, D. J. Brooks and P. Borghammer (2018). "Evaluation of the noradrenergic system in Parkinson's disease: an 11C-MeNER PET and neuromelanin MRI study." *Brain* **141**(2): 496-504.

Sondag, C. M., G. Dhawan and C. K. Combs (2009). "Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia." *J Neuroinflammation* **6**: 1.

Spiegel, J., D. Hellwig, M. O. Mollers, S. Behnke, W. Jost, K. Fassbender, S. Samnick, U. Dillmann, G. Becker and C. M. Kirsch (2006). "Transcranial sonography and [123I]FP-CIT SPECT disclose complementary aspects of Parkinson's disease." *Brain* **129**(Pt 5): 1188-1193.

Stephan J. Schreiber, J. M. V., Florian Doepp (2014). "Transcranial color coded sonography: advanced approach using ultrasound fusion imaging." *International journal of and clinical neurosciences mental health*.

Stockner, H., A. Iranzo, K. Seppi, M. Serradell, V. Gschliesser, M. Sojer, F. Valdeoriola, J. L. Molinuevo, B. Frauscher, C. Schmidauer, J. Santamaria, B. Hogl, E. Tolosa, W. Poewe and S. Group (2009). "Midbrain hyperechogenicity in idiopathic REM sleep behavior disorder." *Mov Disord* **24**(13): 1906-1909.

Stockner, H., M. Sojer, K. S. K., J. Mueller, G. K. Wenning, C. Schmidauer and W. Poewe (2007). "Midbrain sonography in patients with essential tremor." *Mov Disord* **22**(3): 414-417.

Stockwell, B. R., J. P. Friedmann Angeli, H. Bayir, A. I. Bush, M. Conrad, S. J. Dixon, S. Fulda, S. Gascon, S. K. Hatzios, V. E. Kagan, K. Noel, X. Jiang, A. Linkermann, M. E. Murphy, M. Overholtzer, A. Oyagi, G. C. Pagnussat, J. Park, Q. Ran, C. S. Rosenfeld, K. Salnikow, D. Tang, F. M. Torti, S. V. Torti, S. Toyokuni, K. A. Woerpel and D. D. Zhang (2017). "Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease." *Cell* **171**(2): 273-285.

Stolp, H. B. and K. M. Dziegielewska (2009). "Review: Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases." *Neuropathol Appl Neurobiol* **35**(2): 132-146.

Storti, E., F. Cortese, R. Di Fabio, C. Fiorillo, A. Pierallini, A. Tessa, A. Valleriani, F. Pierelli, F. M. Santorelli and C. Casali (2013). "De novo FTL mutation: a clinical, neuroimaging, and molecular study." *Mov Disord* **28**(2): 252-253.

Stoyas, C. A. and A. R. La Spada (2018). "The CAG-polyglutamine repeat diseases: a clinical, molecular, genetic, and pathophysiologic nosology." *Handb Clin Neurol* **147**: 143-170.

Sung, Y. H., C. Rospigliosi and D. Eliezer (2006). "NMR mapping of copper binding sites in alpha-synuclein." *Biochim Biophys Acta* **1764**(1): 5-12.

Svetel, M., M. Mijajlovic, A. Tomic, N. Kresojevic, T. Pekmezovic and V. S. Kostic (2012). "Transcranial sonography in Wilson's disease." *Parkinsonism Relat Disord* **18**(3): 234-238.

Swerdlow, R. H. and S. M. Khan (2009). "The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: an update." *Exp Neurol* **218**(2): 308-315.

Szerdahelyi, P. and P. Kasa (1986). "Histochemical demonstration of copper in normal rat brain and spinal cord. Evidence of localization in glial cells." *Histochemistry* **85**(4): 341-347.

Takeda, A. (2003). "Manganese action in brain function." *Brain Res Brain Res Rev* **41**(1): 79-87.

Tandara, L. and I. Salamunic (2012). "Iron metabolism: current facts and future directions." *Biochem Med (Zagreb)* **22**(3): 311-328.

Tang, Y. and W. Le (2016). "Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases." *Mol Neurobiol* **53**(2): 1181-1194.

Tanimoto, A., K. Oshio, M. Suematsu, D. Pouliquen and D. D. Stark (2001). "Relaxation effects of clustered particles." *J Magn Reson Imaging* **14**(1): 72-77.

Tanimoto, A., D. Pouliquen, B. P. Kreft and D. D. Stark (1994). "Effects of spatial distribution on proton relaxation enhancement by particulate iron oxide." *J Magn Reson Imaging* **4**(5): 653-657.

Taylor, A. (1996). "Detection and monitoring of disorders of essential trace elements." *Ann Clin Biochem* **33** (Pt 6): 486-510.

Taylor, A. (1997). "Measurement of zinc in clinical samples." *Ann Clin Biochem* **34** (Pt 2): 142-150.

Terwel, D., I. Dewachter and F. Van Leuven (2002). "Axonal transport, tau protein, and neurodegeneration in Alzheimer's disease." *Neuromolecular Med* **2**(2): 151-165.

Thinakaran, G. and E. H. Koo (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." *J Biol Chem* **283**(44): 29615-29619.

Thirumoorthy, N., A. Shyam Sunder, K. Manisenthil Kumar, M. Senthil Kumar, G. Ganesh and M. Chatterjee (2011). "A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology." *World J Surg Oncol* **9**: 54.

Tilley, B. C., N. R. LaPelle, C. G. Goetz, G. T. Stebbins and M.-U. T. Force (2014). "Using cognitive pretesting in scale development for Parkinson's disease: the Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS) example." *J Parkinsons Dis* **4**(3): 395-404.

Tribl, F., E. Asan, T. Arzberger, T. Tatschner, E. Langenfeld, H. E. Meyer, G. Bringmann, P. Riederer, M. Gerlach and K. Marcus (2009). "Identification of L-ferritin in neuromelanin granules of the human substantia nigra: a targeted proteomics approach." *Mol Cell Proteomics* **8**(8): 1832-1838.

Tu, P. H., J. E. Galvin, M. Baba, B. Giasson, T. Tomita, S. Leight, S. Nakajo, T. Iwatsubo, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (1998). "Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein." *Ann Neurol* **44**(3): 415-422.

Tumer, Z. and L. B. Moller (2010). "Menkes disease." *Eur J Hum Genet* **18**(5): 511-518.

Turnlund, J. R. (1998). "Human whole-body copper metabolism." *Am J Clin Nutr* **67**(5 Suppl): 960S-964S.

Tuschl, K., P. T. Clayton, S. M. Gospe, Jr., S. Gulab, S. Ibrahim, P. Singhi, R. Aulakh, R. T. Ribeiro, O. G. Barsottini, M. S. Zaki, M. L. Del Rosario, S. Dyack, V. Price, A. Rideout, K. Gordon, R. A. Wevers, W. K. Chong and P. B. Mills (2012). "Syndrome of hepatic cirrhosis, dystonia, polycythemia, and hypermanganesemia caused by mutations in SLC30A10, a manganese transporter in man." *Am J Hum Genet* **90**(3): 457-466.

Tuschl, K., P. B. Mills and P. T. Clayton (2013). "Manganese and the brain." *Int Rev Neurobiol* **110**: 277-312.

Tuschl, K., P. B. Mills, H. Parsons, M. Malone, D. Fowler, M. Bitner-Glindzicz and P. T. Clayton (2008). "Hepatic cirrhosis, dystonia, polycythaemia and hypermanganesaemia--a new metabolic disorder." *J Inherit Metab Dis* **31**(2): 151-163.

Uchino, A., T. Noguchi, K. Nomiyama, Y. Takase, T. Nakazono, J. Nojiri and S. Kudo (2007). "Manganese accumulation in the brain: MR imaging." *Neuroradiology* **49**(9): 715-720.

Uitti, R. J., K. Berry, O. Yasuhara, A. Eisen, H. Feldman, P. L. McGeer and D. B. Calne (1995). "Neurodegenerative 'overlap' syndrome: Clinical and pathological features of Parkinson's disease, motor neuron disease, and Alzheimer's disease." *Parkinsonism Relat Disord* **1**(1): 21-34.

Unger, M. M., M. Belke, K. Menzler, J. T. Heverhagen, B. Keil, K. Stiasny-Kolster, F. Rosenow, N. J. Diederich, G. Mayer, J. C. Moller, W. H. Oertel and S. Knake (2010). "Diffusion tensor imaging in idiopathic REM sleep behavior disorder reveals microstructural changes in the brainstem, substantia nigra, olfactory region, and other brain regions." *Sleep* **33**(6): 767-773.

Uttara, B., A. V. Singh, P. Zamboni and R. T. Mahajan (2009). "Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options." *Curr Neuropharmacol* **7**(1): 65-74.

Uversky, V. N. (2007). "Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation." *J Neurochem* **103**(1): 17-37.

van de Loo, S., U. Walter, S. Behnke, J. Hagenah, M. Lorenz, M. Sitzer, R. Hilker and D. Berg (2010). "Reproducibility and diagnostic accuracy of substantia nigra sonography for the diagnosis of Parkinson's disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **81**(10): 1087-1092.

van den Bogaard, S. J., E. M. Dumas and R. A. Roos (2013). "The role of iron imaging in Huntington's disease." *Int Rev Neurobiol* **110**: 241-250.

van Dyck, C. H., J. P. Seibyl, R. T. Malison, M. Laruelle, E. Wallace, S. S. Zoghbi, Y. Zea-Ponce, R. M. Baldwin, D. S. Charney and P. B. Hoffer (1995). "Age-related decline in striatal dopamine transporter binding with iodine-123-beta-CIT/SPECT." *J Nucl Med* **36**(7): 1175-1181.

Vidal, R., B. Ghetti, M. Takao, C. Brefel-Courbon, E. Uro-Coste, B. S. Glazier, V. Siani, M. D. Benson, P. Calvas, L. Miravalle, O. Rascol and M. B. Delisle (2004). "Intracellular ferritin accumulation in neural and extraneural tissue characterizes a neurodegenerative disease associated with a mutation in the ferritin light polypeptide gene." *J Neuropathol Exp Neurol* **63**(4): 363-380.

Vilas, D., A. Iranzo, C. Pont-Sunyer, M. Serradell, C. Gaig, J. Santamaria and E. Tolosa (2015). "Brainstem raphe and substantia nigra echogenicity in idiopathic REM sleep behavior disorder with comorbid depression." *J Neurol* **262**(7): 1665-1672.

Vroegindewij, L. H., E. H. van der Beek, A. J. Boon, M. Hoogendoorn, J. A. Kievit, J. H. Wilson and J. G. Langendonk (2015). "Aceruloplasminemia presents as Type 1 diabetes in non-obese adults: a detailed case series." *Diabet Med* **32**(8): 993-1000.

Vroegindewij, L. H. P., A. J. W. Boon, J. H. P. Wilson and J. G. Langendonk (2019). "Aceruloplasminemia: Neurodegeneration with brain iron accumulation associated with psychosis." *J Inherit Metab Dis* **42**(2): 195-196.

Vymazal, J., R. A. Brooks, C. Baumgarner, V. Tran, D. Katz, J. W. Bulte, R. Bauminger and G. Di Chiro (1996). "The relation between brain iron and NMR relaxation times: an in vitro study." *Magn Reson Med* **35**(1): 56-61.

Vymazal, J., J. Klempir, R. Jech, J. Zidovska, M. Syka, E. Ruzicka and J. Roth (2007). "MR relaxometry in Huntington's disease: correlation between imaging, genetic and clinical parameters." *J Neurol Sci* **263**(1-2): 20-25.

Walter, U. (2009). "Transcranial brain sonography findings in Parkinson's disease: implications for pathogenesis, early diagnosis and therapy." *Expert Rev Neurother* **9**(6): 835-846.

Walter, U. (2010). "Transcranial sonography in brain disorders with trace metal accumulation." *Int Rev Neurobiol* **90**: 166-178.

Walter, U. (2011). "Substantia nigra hyperechogenicity is a risk marker of Parkinson's disease: no." *J Neural Transm (Vienna)* **118**(4): 607-612.

Walter, U. (2013). "How to measure substantia nigra hyperechogenicity in Parkinson disease: detailed guide with video." *J Ultrasound Med* **32**(10): 1837-1843.

Walter, U., S. Behnke, J. Eyding, L. Niehaus, T. Postert, G. Seidel and D. Berg (2007). "Transcranial brain parenchyma sonography in movement disorders: state of the art." *Ultrasound Med Biol* **33**(1): 15-25.

Walter, U., A. Blitzer, R. Benecke, A. Grossmann and D. Dressler (2014). "Sonographic detection of basal ganglia abnormalities in spasmodic dysphonia." *Eur J Neurol* **21**(2): 349-352.

Walter, U., D. Dressler, C. Lindemann, A. Slachevsky and M. Miranda (2008). "Transcranial sonography findings in welding-related Parkinsonism in comparison to Parkinson's disease." *Mov Disord* **23**(1): 141-145.

Walter, U., D. Dressler, T. Probst, A. Wolters, M. Abu-Mugheisib, M. Wittstock and R. Benecke (2007). "Transcranial brain sonography findings in discriminating between parkinsonism and idiopathic Parkinson disease." *Arch Neurol* **64**(11): 1635-1640.

Walter, U., D. Dressler, A. Wolters, T. Probst, A. Grossmann and R. Benecke (2004). "Sonographic discrimination of corticobasal degeneration vs progressive supranuclear palsy." *Neurology* **63**(3): 504-509.

Walter, U., D. Dressler, A. Wolters, M. Wittstock and R. Benecke (2007). "Transcranial brain sonography findings in clinical subgroups of idiopathic Parkinson's disease." *Mov Disord* **22**(1): 48-54.

Walter, U., D. Dressler, A. Wolters, M. Wittstock, B. Greim and R. Benecke (2006). "Sonographic discrimination of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia." *J Neurol* **253**(4): 448-454.

Walter, U., M. Kanowski, J. Kaufmann, A. Grossmann, R. Benecke and L. Niehaus (2008). "Contemporary ultrasound systems allow high-resolution transcranial imaging of small echogenic deep intracranial structures similarly as MRI: a phantom study." *Neuroimage* **40**(2): 551-558.

Walter, U., K. Krolkowski, B. Tarnacka, R. Benecke, A. Czlonkowska and D. Dressler (2005). "Sonographic detection of basal ganglia lesions in asymptomatic and symptomatic Wilson disease." *Neurology* **64**(10): 1726-1732.

Walter, U., J. U. Muller, J. Rosche, M. Kirsch, A. Grossmann, R. Benecke, M. Wittstock and A. Wolters (2016). "Magnetic resonance-transcranial ultrasound fusion imaging: A novel tool for brain electrode location." *Mov Disord* **31**(3): 302-309.

Walter, U., L. Niehaus, T. Probst, R. Benecke, B. U. Meyer and D. Dressler (2003). "Brain parenchyma sonography discriminates Parkinson's disease and atypical parkinsonian syndromes." *Neurology* **60**(1): 74-77.

Walter, U. and D. Skoloudik (2014). "Transcranial sonography (TCS) of brain parenchyma in movement disorders: quality standards, diagnostic applications and novel technologies." *Ultraschall Med* **35**(4): 322-331.

Walter, U., M. Skowronska, T. Litwin, G. M. Szapak, K. Jablonka-Salach, D. Skoloudik, E. Bulska and A. Czlonkowska (2014). "Lenticular nucleus hyperechogenicity in Wilson's disease reflects local copper, but not iron accumulation." *J Neural Transm (Vienna)* **121**(10): 1273-1279.

Walter, U., M. Wittstock, R. Benecke and D. Dressler (2002). "Substantia nigra echogenicity is normal in non-extrapyramidal cerebral disorders but increased in Parkinson's disease." *J Neural Transm (Vienna)* **109**(2): 191-196.

Wan, W., L. Jin, Z. Wang, L. Wang, G. Fei, F. Ye, X. Pan, C. Wang and C. Zhong (2017). "Iron Deposition Leads to Neuronal alpha-Synuclein Pathology by Inducing Autophagy Dysfunction." *Front Neurol* **8**: 1.

Wang, D., Y. Y. Li, J. H. Luo and Y. H. Li (2014). "Age-related iron deposition in the basal ganglia of controls and Alzheimer disease patients quantified using susceptibility weighted imaging." *Arch Gerontol Geriatr* **59**(2): 439-449.

Wang, W., M. A. Knovich, L. G. Coffman, F. M. Torti and S. V. Torti (2010). "Serum ferritin: Past, present and future." *Biochim Biophys Acta* **1800**(8): 760-769.

Wang, Y., S. R. Butros, X. Shuai, Y. Dai, C. Chen, M. Liu, E. M. Haacke, J. Hu and H. Xu (2012). "Different iron-deposition patterns of multiple system atrophy with predominant parkinsonism and idiopathic Parkinson diseases demonstrated by phase-corrected susceptibility-weighted imaging." *AJNR Am J Neuroradiol* **33**(2): 266-273.

Wang, Y. and T. Liu (2015). "Quantitative susceptibility mapping (QSM): Decoding MRI data for a tissue magnetic biomarker." *Magn Reson Med* **73**(1): 82-101.

Ward, R. J., F. A. Zucca, J. H. Duyn, R. R. Crichton and L. Zecca (2014). "The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders." *Lancet Neurol* **13**(10): 1045-1060.

Whittall, K. P., A. L. MacKay, D. A. Graeb, R. A. Nugent, D. K. Li and D. W. Paty (1997). "In vivo measurement of T2 distributions and water contents in normal human brain." *Magn Reson Med* **37**(1): 34-43.

Wills, A. J., G. V. Sawle, P. R. Guilbert and A. R. Curtis (2002). "Palatal tremor and cognitive decline in neuroferritinopathy." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **73**(1): 91-92.

Wollenweber, F. A., R. Schomburg, M. Probst, V. Schneider, T. Hiry, A. Ochsenfeld, M. Mueller, U. Dillmann, K. Fassbender and S. Behnke (2011). "Width of the third ventricle assessed by transcranial sonography can monitor brain

atrophy in a time- and cost-effective manner--results from a longitudinal study on 500 subjects." *Psychiatry Res* **191**(3): 212-216.

Wong, R. J., R. Gish, M. Schilsky and C. Frenette (2011). "A clinical assessment of Wilson disease in patients with concurrent liver disease." *J Clin Gastroenterol* **45**(3): 267-273.

Wright, J. A., X. Wang and D. R. Brown (2009). "Unique copper-induced oligomers mediate alpha-synuclein toxicity." *FASEB J* **23**(8): 2384-2393.

Wu, F., J. Wang, C. Pu, L. Qiao and C. Jiang (2015). "Wilson's disease: a comprehensive review of the molecular mechanisms." *Int J Mol Sci* **16**(3): 6419-6431.

Xiao, Y., X. Chen, S. Huang, G. Li, M. Mo, L. Zhang, C. Chen, W. Guo, M. Zhou, Z. Wu, L. Cen, S. Long, S. Li, X. Yang, S. Qu, Z. Pei and P. Xu (2018). "Iron promotes alpha-synuclein aggregation and transmission by inhibiting TFEB-mediated autophagosome-lysosome fusion." *J Neurochem* **145**(1): 34-50.

Yamaguchi, M., K. Arai, M. Asahina and T. Hattori (2003). "Laryngeal stridor in multiple system atrophy." *Eur Neurol* **49**(3): 154-159.

Yang, W. S. and B. R. Stockwell (2016). "Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation." *Trends Cell Biol* **26**(3): 165-176.

Yao, B., T. Q. Li, P. Gelderen, K. Shmueli, J. A. de Zwart and J. H. Duyn (2009). "Susceptibility contrast in high field MRI of human brain as a function of tissue iron content." *Neuroimage* **44**(4): 1259-1266.

Yilmaz, R. and D. Berg (2018). "Transcranial B-Mode Sonography in Movement Disorders." *Int Rev Neurobiol* **143**: 179-212.

Yilmaz, R., A. Pilotto, B. Roeben, O. Preische, U. Suenkel, S. Heinzl, F. G. Metzger, C. Laske, W. Maetzler and D. Berg (2017). "Structural Ultrasound of the Medial Temporal Lobe in Alzheimer's Disease." *Ultraschall Med* **38**(3): 294-300.

Yin, F., H. Sancheti and E. Cadenas (2012). "Mitochondrial thiols in the regulation of cell death pathways." *Antioxid Redox Signal* **17**(12): 1714-1727.

Yonekawa, M., T. Okabe, Y. Asamoto and M. Ohta (1999). "A case of hereditary ceruloplasmin deficiency with iron deposition in the brain associated with chorea, dementia, diabetes mellitus and retinal pigmentation: administration of fresh-frozen human plasma." *Eur Neurol* **42**(3): 157-162.

Youn, J., J. S. Kim, H. T. Kim, J. Y. Lee, P. H. Lee, C. S. Ki and J. W. Cho (2012). "Characteristics of neurological Wilson's disease without Kayser-Fleischer ring." *J Neurol Sci* **323**(1-2): 183-186.

Yuen, H. W. and W. Becker (2020). Iron Toxicity. *StatPearls*. Treasure Island (FL).

Zecca, L., D. Berg, T. Arzberger, P. Ruprecht, W. D. Rausch, M. Musicco, D. Tampellini, P. Riederer, M. Gerlach and G. Becker (2005). "In vivo detection of iron and neuromelanin by transcranial sonography: a new approach for early detection of substantia nigra damage." *Mov Disord* **20**(10): 1278-1285.

Zecca, L., L. Casella, A. Albertini, C. Bellei, F. A. Zucca, M. Engelen, A. Zadlo, G. Szewczyk, M. Zareba and T. Sarna (2008). "Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease." *J Neurochem* **106**(4): 1866-1875.

Zecca, L., M. Gallorini, V. Schunemann, A. X. Trautwein, M. Gerlach, P. Riederer, P. Vezzoni and D. Tampellini (2001). "Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes." *J Neurochem* **76**(6): 1766-1773.

Zecca, L., A. Stroppolo, A. Gatti, D. Tampellini, M. Toscani, M. Gallorini, G. Giaveri, P. Arosio, P. Santambrogio, R. G. Fariello, E. Karatekin, M. H. Kleinman, N. Turro, O. Hornykiewicz and F. A. Zucca (2004). "The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(26): 9843-9848.

Zecca, L., H. Wilms, S. Geick, J. H. Claassen, L. O. Brandenburg, C. Holzknicht, M. L. Panizza, F. A. Zucca, G. Deuschl, J. Sievers and R. Lucius (2008). "Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease." *Acta Neuropathol* **116**(1): 47-55.

Zhou, H. Y., P. Huang, Q. Sun, J. J. Du, S. S. Cui, Y. Y. Hu, W. W. Zhan, Y. Wang, Q. Xiao, J. Liu, Y. Y. Tan and S. D. Chen (2018). "The role of substantia nigra sonography in the differentiation of Parkinson's disease and multiple system atrophy." *Transl Neurodegener* **7**: 15.

Zoroddu, M. A., J. Aaseth, G. Crisponi, S. Medici, M. Peana and V. M. Nurchi (2019). "The essential metals for humans: a brief overview." *J Inorg Biochem* **195**: 120-129.

Zorov, D. B., M. Juhaszova and S. J. Sollott (2014). "Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release." *Physiol Rev* **94**(3): 909-950.

Zorzi, G., F. Zibordi, L. Chiapparini, E. Bertini, L. Russo, A. Piga, F. Longo, B. Garavaglia, D. Aquino, M. Savoardo, A. Solari and N. Nardocci (2011). "Iron-related MRI images in patients with pantothenate kinase-associated neurodegeneration (PKAN) treated with deferiprone: results of a phase II pilot trial." *Mov Disord* **26**(9): 1756-1759.

Zucca, F. A., C. Bellei, S. Giannelli, M. R. Terreni, M. Gallorini, E. Rizzio, G. Pezzoli, A. Albertini and L. Zecca (2006). "Neuromelanin and iron in human locus coeruleus and substantia nigra during aging: consequences for neuronal vulnerability." *J Neural Transm (Vienna)* **113**(6): 757-767.

Příloha I – seznam publikací

Publikace, které jsou podkladem disertace:

- 1) Maskova J, Skoloudik D, Burgetova A, et al. Comparison of transcranial sonography-magnetic resonance fusion imaging in Wilson's and early-onset Parkinson's diseases. *Parkinsonism Relat Disord* 2016;28:87-93. **IF = 4.494**
- 2) Skoloudik D, Maskova J, Dusek P, et al. Digitized Image Analysis of Insula Echogenicity Detected by TCS-MR Fusion Imaging in Wilson's and Early-Onset Parkinson's Diseases. *Ultrasound Med Biol* 2020;46:842-848. **IF = 3.452**
- 3) Maskova J, Skoloudik D, Stofanikova P, et al. Comparative study of the substantia nigra echogenicity and ¹²³I-Ioflupane SPECT in patients with synucleinopathies with and without REM sleep behavior disorder. *Sleep Medicine* 2020 **IF = 3.36, přijato k publikaci**

Ostatní práce:

- 4) Dusek P, Skoloudik D, Maskova J, et al. Brain iron accumulation in Wilson's disease: A longitudinal imaging case study during anticopper treatment using 7.0T MRI and transcranial sonography. *J Magn Reson Imaging* 2017. **IF = 3.612**
- 5) Skoloudik D, Bartova P, Maskova J, et al. Transcranial Sonography of the Insula: Digitized Image Analysis of Fusion Images with Magnetic Resonance. *Ultraschall Med* 2016;37:604-608. **IF = 3.732**

ARTICLE IN PRESS

Parkinsonism and Related Disorders xxx (2016) 1–7



Contents lists available at ScienceDirect

Parkinsonism and Related Disorders

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parkreldis



Comparison of transcranial sonography-magnetic resonance fusion imaging in Wilson's and early-onset Parkinson's diseases

Jana Mašková^a, David Školoudík^{a, b}, Andrea Burgetová^c, Ondřej Fiala^{a, d}, Radan Brůha^e, Daniela Záhoráková^f, Tereza Serranová^a, Matěj Slovák^a, Olga Ulmanová^a, Evžen Růžička^a, Petr Dušek^{a, g, *}

^a Department of Neurology and Center of Clinical Neuroscience, Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine and General University Hospital in Prague, Kateřinská 30, 128 21, Prague, Czech Republic

^b Department of Nursing, Faculty of Health Science, Palacky University Olomouc, Tr. Svobody 8, 771 11, Olomouc, Czech Republic

^c Department of Radiology, Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine and General University Hospital in Prague, Kateřinská 30, 128 21, Prague, Czech Republic

^d Institute of Neuropsychiatric Care (INEP), Křížkova 264/22, 186 00, Prague, Czech Republic

^e 4th Department of Internal Medicine, Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine and General University Hospital in Prague, U Nemocnice 2, 128 08, Prague, Czech Republic

^f Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine and General University Hospital in Prague, Ke Karlovu 2, 121 00, Prague, Czech Republic

^g Institute of Neuroradiology, Universitaetsmedizin Goettingen, Robert-Koch-Str. 40, 37075, Goettingen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2015

Received in revised form

20 April 2016

Accepted 26 April 2016

Keywords:

Transcranial sonography

MRI

Wilson's disease

Early-onset Parkinson's disease

Copper

ABSTRACT

Introduction: Wilson's disease (WD) is a hereditary disorder caused by *ATP7B* mutations resulting in systemic copper accumulation. WD may manifest as early-adulthood parkinsonism; and atypical cases may be difficult to distinguish from early-onset Parkinson's disease (EO-PD), a neurodegenerative disorder with onset ≤ 40 years of age. The aim of our study was to compare transcranial sonography (TCS) –magnetic resonance fusion imaging in WD and EO-PD and examine whether TCS can provide clinically useful information.

Methods: We examined 22 WD, 16 EO-PD, and 24 healthy control subjects. We measured echogenicity and determined presence of MRI signal changes in T2-weighted images in the substantia nigra (SN) and lentiform nucleus (NL). TCS with the capability of magnetic resonance fusion and Virtual Navigator was used. The echogenicity indices of SN and NL were processed using digital image analysis to eliminate subjective evaluation errors.

Results: Mean SN echogenicity index in EO-PD (39.8 ± 5.9 [SD]) was higher compared to WD (28.0 ± 4.6 , $p < 0.0001$) and control subjects (28.8 ± 4.9 , $p < 0.0001$). Mean NL echogenicity index was higher in WD (117.5 ± 37.0) compared to EO-PD (61.6 ± 5.4 , $p < 0.0001$) and control subjects (54.9 ± 11.2 , $p < 0.0001$). The SN hyperechogenicity had sensitivity 93.8%, and specificity 90.9%, while the NL hyperechogenicity had sensitivity 95.5% and specificity 93.8% for differentiation of WD and EO-PD. NL hyperechogenicity was more pronounced in WD subjects with putaminal MRI T2 hyperintensity ($p < 0.05$) but was also present in subjects without MRI abnormality.

Conclusions: There are distinct TCS findings in WD and EO-PD complementary to MRI that can be utilized as highly sensitive and specific biomarkers of these disorders.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Wilson's disease (WD) is a hereditary disorder caused by *ATP7B* mutations resulting in copper accumulation in liver and brain. Timely diagnosis is essential since patients have a good prognosis if the treatment is provided in the early stage [1]. Diagnosis of

* Corresponding author. Dept. of Neurology and Center of Clinical Neuroscience, Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine and General University Hospital in Prague, Kateřinská 30, 120 00, Praha 2, Czech Republic.

E-mail address: petr.dusek@vfn.cz (P. Dušek).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.04.031>

1353-8020/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: J. Mašková, et al., Comparison of transcranial sonography-magnetic resonance fusion imaging in Wilson's and early-onset Parkinson's diseases, Parkinsonism and Related Disorders (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.04.031>

neurological WD is straightforward in the majority of cases when typical biochemical abnormalities are present [2]. However, the diagnosis may be difficult in atypical cases that do not fulfill all the clinical and laboratory criteria [3]. Moreover, genetic confirmation may be difficult since *ATP7B* gene is large and more than 500 mutations were described [1], some of them with questionable pathogenicity [4].

According to guidelines, every patient with young adulthood-onset movement disorder should undergo screening for WD. WD may manifest with parkinsonism, either isolated or in combination with other symptoms such as dystonia, kinetic tremor or ataxia. In early-onset Parkinson's disease (EO-PD), parkinsonism is frequently accompanied by psychiatric symptoms and dystonia [5]. Therefore, the importance of the differential diagnosis between EO-PD and WD may arise, particularly in cases with atypical symptoms and/or inconclusive results of biochemical examinations.

Transcranial sonography (TCS) is a validated tool in the diagnosis of an early stage of PD [6] as well as in the differential diagnosis of PD and atypical parkinsonian syndromes [6,7] and dopa-responsive dystonia [8]. Typical findings in PD consist particularly of the hyperechogenicity and enlarged echogenic size of substantia nigra (SN) [6,9,10]. In the neurological form of WD, the echogenicity of SN is variable, while the hyperechogenicity of the lentiform nucleus (NL) has been consistent across studies [11–15]. It is unclear how echogenicity changes in WD interrelate to MRI abnormalities that typically consist of hyperintensity of basal ganglia, brainstem, and thalamus in T2-weighted (T2w) images [16].

Considering these different findings in EO-PD and WD patients, TCS could be a time-saving, low-cost, screening examination of these disorders. Potential drawbacks of TCS are limited anatomical clarity and dependence on examiner's subjective evaluation of hyperechogenicity. These obstacles are partially overcome by using Virtual Navigator for fusion of TCS and MRI which helps in precise identification of brain structures [17] and recently validated method of digital image analysis which reduces the sonographer's bias in the assessment of hyperechogenicity [18].

The aim of the study was to compare the echogenicity changes in SN and NL in EO-PD and WD in relation to MRI results and assess the utility of TCS as a screening examination in early-onset parkinsonism.

2. Methods

2.1. Patients

In WD patients, inclusion criterion was neurological WD with diagnosis established according to Leipzig criteria [19]. In EO-PD patients, inclusion criteria were diagnosis in accordance with the UK Parkinson's Disease Society Brain Bank criteria [20], and age at onset ≤ 40 years. For both groups, exclusion criteria were presence of deep brain stimulation (DBS) electrodes and insufficient temporal bone window for TCS examination. Out of 37 neurological WD patients from our database, 15 were not reachable or disagreed to participate. Out of 59 EO-PD patients from our database 21 were excluded because of DBS, 21 disagreed to participate and one was excluded due to insufficient temporal bone window. Twenty-two WD and 16 EO-PD patients participated in the study. The control group consisted of 24 healthy subjects with no neuropsychiatric disorder. All subjects signed informed consent and the study was approved by the Ethical Committee of General Teaching Hospital in Prague.

Information about initial clinical symptoms, abnormal serum ceruloplasmin concentration, urine copper excretion, liver copper concentration, and the presence of K-F ring at the time of diagnosis was retrieved from medical records.

Twenty WD patients were on a stable medication while two were *de novo* treatment naïve patients at the time of examination (Table 1). Fifteen PD patients were on a stable antiparkinsonian medication while one was treatment naïve. All PD patients were tested for *PARK2* mutations; heterozygous pathogenic mutation was found in one. Neurological impairment was assessed by the Unified Wilson's Disease Rating Scale (UWDRS) [21] in WD and by the Unified Parkinson's Disease Rating Scale, Part III (UPDRS-III) in EO-PD group respectively. Patients were examined on their usual symptomatic therapy. "Joint parkinsonism subscore" was calculated from items present jointly in both scales in order to compare the severity of parkinsonism in WD and EO-PD groups. This subscore consists of UPDRS-III except items 24, 30 and 31.

2.2. Magnetic resonance imaging

MRI was performed using 1.5 T whole body Philips Achieva system in EO-PD and WD patients. Standard spin echo T1w (resolution = $1.2 \times 1.2 \times 3 \text{ mm}^3$, TE = 15 ms, TR = 500 ms) and T2w (resolution = $0.5 \times 0.5 \times 2 \text{ mm}^3$, TE = 233 ms, TR = 2250 ms) sequences covering the whole brain were employed to quantify brain damage and generate anatomical images for TCS fusion. An experienced neuroradiologist blinded to the diagnosis quantified the MRI pathology. Degree of atrophy was graded as absent (0 points) mild (1 point) or severe (2 points) in three locations: 1) cerebellum and brainstem, 2) basal ganglia and subcortical region and 3) cortex. At that, presence of T2 hyperintensities in the caudate nucleus, putamen, globus pallidus, thalamus, mesencephalon, pons and T2 hypointensities in the NL, SN, and dentate nucleus were scored by 1 point each. The total sum of atrophy and signal changes build the composite MRI severity score (maximum 15 points) [22].

2.3. Transcranial sonography

The ultrasound system MyLab Twice (Esaote S.p.A., Genova, Italy) was equipped with the Virtual Navigation (MedCom GmbH, Darmstadt, Germany), which allows real-time image fusion of TCS and MRI images. The ultrasound scanner with a Reusable Tracking Bracket (CIVCO, Kalona, IA, USA) and sensor mount were used. The Virtual Navigator technology was implemented using an electromagnetic tracking system, composed of a transmitter and a small receiver, mounted on the ultrasound probe. SN was imaged in the axial mesencephalic plane (Fig. 1A) while NL and caudate nucleus (CN) were imaged in the axial thalamic plane (Fig. 1B) using the Fusion Imaging technique.

Following parameters were used: penetration depth of 16 cm, penetration high, dynamic range 7 (50 dB), frequency 1–4 MHz, enhancement 3, density 2, view 9, persistence 7, dynamic compression 0, gain 36%, grey map 0, S-view off, 2 focuses in 5 and 10 cm, mechanical index 0.9, tissue indices T1s 1.0, T1B 1.0 and TIC 2.1.

The butterfly-shaped structure of the mesencephalic brainstem and the region of SN in mesencephalic section and CN and LN in the thalamic section were depicted and images were saved in 8-bit grayscale DICOM format for offline analysis. Predefined elliptical ROIs were manually placed in the region of contralateral CN and LN and ipsilateral SN (Supplementary Figure). The echogenicity indices were calculated separately for SN, CN and LN from both right and left temporal bone windows using the B-Mode Assist software for digital image analysis [18,23]; the higher value of both measurements was used for analysis.

Standard visual assessment of SN and LN echogenicity [24] was also performed and results were compared with those obtained by digital image analysis. The mean SN echogenic area from both sides

Table 1
Demography, clinical and TCS findings.

	WD	EO-PD	Control
Number of patients (females)	22 (11)	16 (9)	24 (16)
Age; mean \pm SD (years) ^a	43.9 \pm 8.7	42.2 \pm 5.2	37.6 \pm 10.3
Duration of disease; mean \pm SD (years) ^b	17.1 \pm 9.9	7.7 \pm 4.7	–
Duration of therapy; mean \pm SD (years) ^b	13.5 \pm 7.2	3.8 \pm 1.9	–
UPDRS-III subscore; mean; median (interquartile range)	–	21.3; 16.0 (12.0–32.0)	–
UWDRS neurologic subscore; mean; median (interquartile range)	19.6; 13.5 (7.0–30.5)	–	–
UWDRS/UPDRS-III joint parkinsonism subscore; mean; median (interquartile range) ^c	9.1; 4.5 (2.0–14.3)	14.9, 13.0 (9.0–21.0)	–
L-DOPA equivalent; mean \pm SD (mg)	–	623.4 \pm 453.2	–
Number of patients on d-PEN/Zinc/combo treatment	7/8/4	–	–
Composite MRI severity score; mean; median (interquartile range) ^b	5.9, 6.0 (2.0–8.5)	2.3, 2.0 (1.0–3.5)	–
TCS results			
SN echogenicity index; mean \pm SD ^d	28.0 \pm 4.6	39.8 \pm 5.9	28.8 \pm 4.9
NL echogenicity index; mean \pm SD ^e	117.5 \pm 37.0	61.6 \pm 5.4	54.9 \pm 11.2
CN echogenicity index; mean \pm SD ^f	47.5 \pm 16.5	39.6 \pm 9.2	34.4 \pm 7.4
SN echogenic area (cm ²); mean \pm SD ^d	0.20 \pm 0.03	0.26 \pm 0.04	0.19 \pm 0.03
Subject with abnormal SN echogenicity; n (%) ^g	4/22 (18%)	12/16 (75%)	3/24 (13%)
Subjects with abnormal NL echogenicity; n (%) ^g	15/22 (68%)	3/16 (19%)	3/24 (13%)
Established WD diagnostic methods			
Subjects with abnormal serum ceruloplasmin (<0.2 g/l); n (%) ^h	17/22 (77%)	2/15 (13%)	N.A.
Subjects with abnormal 24-h urine copper excretion (>1 μ mol/24 h); n (%) ^h	21/22 (95%)	2/12 (15%)	N.A.
Subjects with positive K-F ring; n (%) ^h	15/22 (68%)	0/12 (0%)	N.A.
Subjects with abnormal liver copper concentration (>250 μ g/g dry tissue); n (%)	20/20 (100%)	N.A.	N.A.
Subjects with confirmed pathogenic mutation of <i>ATP7B</i> ; n (%) ⁱ	16/22 (73%)	N.A.	N.A.

Abbreviations: WD – Wilson disease, EO-PD, early-onset Parkinson's disease, UWDRS – Unified Wilson's Disease Rating Scale, UPDRS-III – Unified Parkinson's Disease Rating Scale, Part III; d-PEN – d-penicillamine, SN – substantia nigra, NL – lentiform nucleus, CN – caudate nucleus, N.A. – not available.

^a $p < 0.05$ WD compared to controls (ANOVA and Tukey's post-hoc test).

^b $p < 0.01$ WD compared to EO-PD (Mann-Whitney *U* test).

^c $p < 0.05$ EO-PD compared to WD (Mann-Whitney *U* test).

^d $p < 0.0001$ EO-PD compared to WD and controls (ANOVA and Tukey's post-hoc test).

^e $p < 0.0001$ WD compared to EO-PD and controls (ANOVA and Tukey's post-hoc test).

^f $p < 0.01$ WD compared to controls (ANOVA and Tukey's post-hoc test).

^g $p < 0.001$ (Fischer's exact test).

^h Sequencing of coding regions of the *ATP7B* gene revealed homozygous p.[His1069Gln] mutation in 10 and compound heterozygous mutation p.[His1069Gln] and: [Gly1176Arg] in 1; [Arg778Gly] in 1; [Val1262Phe] in 1; [Gly710Ser] in 2; and [Ala1135fs] in 1 subject. Homozygous p.[Lys1248Thrfs*83] mutation was detected in 1 subject.

was compared in WD, EO-PD, and control group. In the calculation of sensitivity/specificity for differentiation of WD and EO-PD, the larger echogenic area of the two sides was employed while SN hyperechogenicity was defined as echogenic area >0.24 cm². Echogenic signals from NL in comparison to surrounding tissue were assessed visually and rated as "normal" or "hyperechogenic". The echogenicity of NL was regarded as abnormal when hyperechogenic signal was detected at least on one side. A single sonographer who was blinded to the patients' diagnoses but not to movement disorders symptoms performed examinations and image analyses.

2.4. Statistics

The Shapiro-Wilk test was used for normality testing. Data with a normal distribution are reported as mean \pm standard deviation. Variables not fitting the normal distribution are presented as a mean, median and interquartile range. Comparisons between two groups were performed using the Mann-Whitney *U* test. Group differences among WD, EO-PD, and control groups were tested using one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test. Receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted and sensitivity/specificity was calculated for determined cut-off points of SN, NL and CN echogenicity. Sensitivities/specificities were calculated from contingency tables for serum ceruloplasmin, 24-h urine copper excretion, presence of K-F ring, and visually assessed SN and NL hyperechogenicity; frequencies were compared by Fischer's exact test. Dependence of variables was assessed using Pearson correlation coefficient. All reported *p*-values are two-tailed. Statistical evaluations were performed using the GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Clinical assessment

Demographic and medical data are shown in Table 1. The age-range was wider and mean age slightly lower in control subjects but age and echogenicity indices in examined structures were not significantly correlated (data not shown), in accordance with a population study examining SN echogenic area [9]. Twenty-one WD subjects fulfilled the clinical criteria for hypokinetic-rigid syndrome (i.e. presence of akinesia and one of the following: rigidity, tremor or postural instability). Parkinsonian symptoms were more severe in the EO-PD group as documented by higher joint parkinsonism score ($p < 0.05$). Four WD cases initially manifested with isolated parkinsonism and one EO-PD case manifested with leg dystonia. Sensitivities/specificities for WD and EO-PD differentiation were calculated for established screening methods reaching 77/88% for serum ceruloplasmin concentration, 95/83% for 24-h urinary copper excretion and 68/100% for K-F ring.

3.2. TCS findings

The EO-PD group exhibited SN hyperechogenicity and the WD group NL hyperechogenicity in comparison with the control group (Fig. 2). Group analysis of digital image analysis results was significant for both brain areas, SN ($F [2, 59] = 30.0$, $p < 0.0001$) and NL ($F [2, 59] = 47.2$, $p < 0.0001$). Post-hoc Tukey's test showed that SN echogenicity in the EO-PD group was significantly higher than in the WD ($p < 0.0001$) and control ($p < 0.0001$) groups and that NL echogenicity was significantly higher in the WD group compared to the EO-PD ($p < 0.0001$) and controls ($p < 0.0001$). Similar pattern as

Please cite this article in press as: J. Mašková, et al., Comparison of transcranial sonography-magnetic resonance fusion imaging in Wilson's and early-onset Parkinson's diseases, Parkinsonism and Related Disorders (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreidis.2016.04.031>

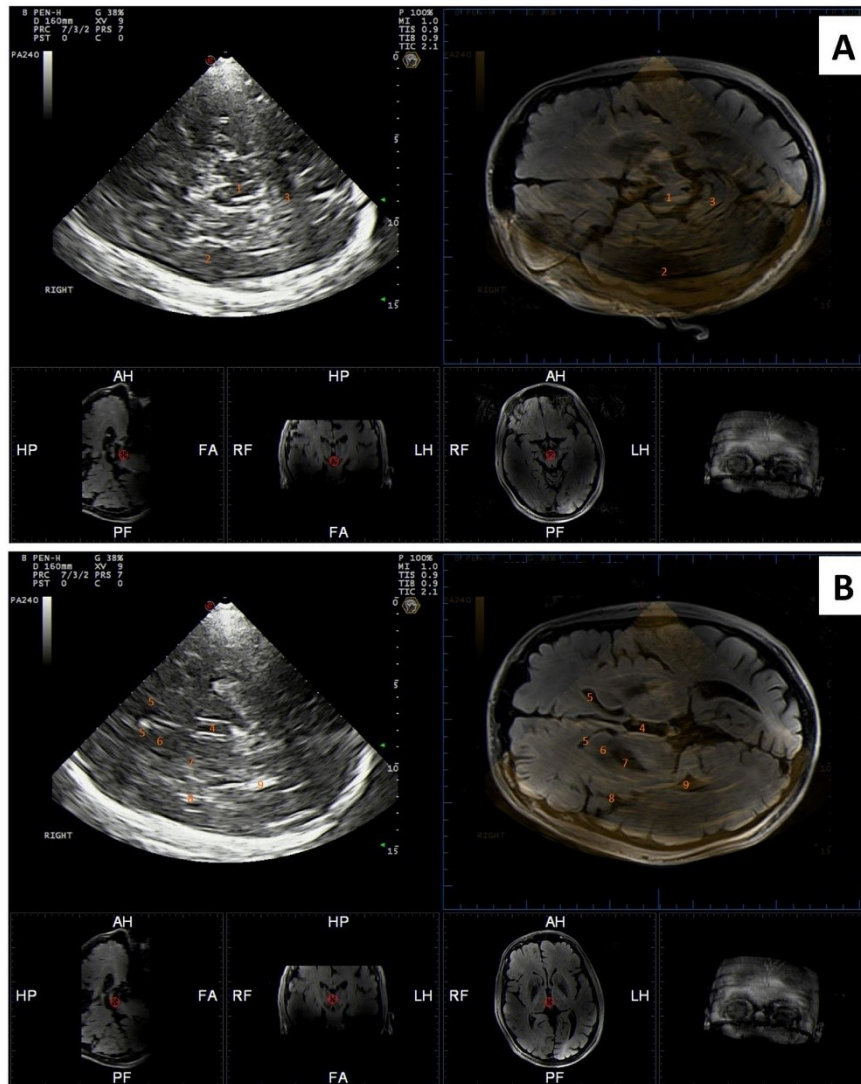


Fig. 1. Typical TCS findings in WD patient with corresponding MRI images using the fusion imaging technique. A) axial mesencephalic plane showing normal echogenicity of a substantia nigra; B) axial thalamic plane showing hyperechogenic lentiform nucleus. Numbers indicate following anatomical structures: 1 – mesencephalon; 2 – temporal lobe; 3 – cerebellum; 4 – third ventricle; 5 – frontal horn of lateral ventricle; 6 – caudate nucleus; 7 – lentiform nucleus; 8 – insula; 9 – occipital horn of lateral ventricle.

in NL, but with weaker significance, was observed also in CN (Table 1).

The cut-off value for SN and LN echogenicity indices were determined 33.7 and 71.9 respectively. SN hyperechogenicity reached sensitivity 93.8%, specificity 90.9% and area under the ROC curve (AUC) of 0.972 (95% confidence interval = 0.928–1.00, $p < 0.0001$), while NL hyperechogenicity reached sensitivity 95.5%, specificity 93.8% and AUC of 0.992 (95% confidence

interval = 0.973–1.00, $p < 0.0001$) for a differentiation of WD and EO-PD (Fig. 3).

The visual assessment of SN echogenicity detected significantly larger mean SN echogenic area in EO-PD subjects compared to WD ($p < 0.0001$) and controls ($p < 0.0001$). The sensitivity/specificity of visually assessed hyperechogenicity was 75/82% in SN and 68/81% in NL for WD and EO-PD differentiation.

Please cite this article in press as: J. Mašková, et al., Comparison of transcranial sonography–magnetic resonance fusion imaging in Wilson's and early-onset Parkinson's diseases, Parkinsonism and Related Disorders (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.04.031>

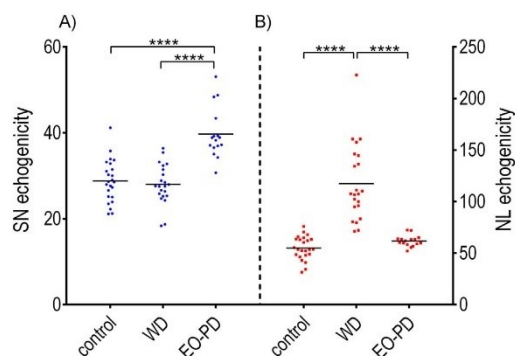


Fig. 2. Echogenicity index in A) substantia nigra (SN) and B) lentiform nucleus (NL) in control subjects, Wilson disease (WD) and early-onset Parkinson's disease (EO-PD) groups. Y-axes are differently adjusted for SN and NL values respectively. Echogenicity index in CN exhibited similar pattern as in NL and is thus not depicted in this graph.

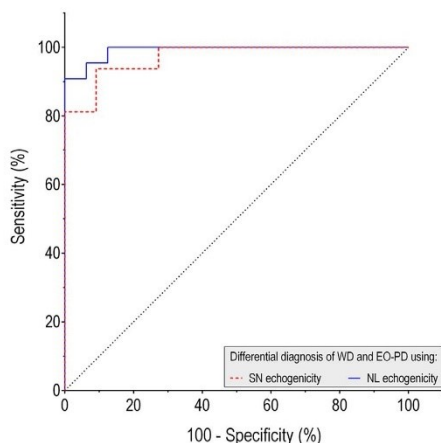


Fig. 3. Receiver operating characteristic (ROC) of substantia nigra (SN, dashed line) and lentiform nucleus (NL, solid line) echogenicity in the differential diagnosis of Wilson's disease and early-onset Parkinson's disease.

3.3. Correlation between TCS, MRI, and clinical parameters

TCS findings of two *de novo* WD patients did not differ from patients on chronic treatment (NL echogenicity index 134.2 and 107.5 vs. 117.1 ± 38.6, $p = 0.70$). Furthermore, we did not find correlation between the NL echogenicity index and age ($r = -0.36$, $p = 0.10$), disease duration ($r = -0.32$, $p = 0.14$), treatment duration ($r = -0.21$, $p = 0.36$) or UWDRS score ($r = 0.36$, $p = 0.10$) in the WD group. In EO-PD group, we did not observe correlation between SN echogenicity index and age ($r = 0.06$, $p = 0.84$), disease duration ($r = -0.14$, $p = 0.61$) and UPDRS-III score ($r = 0.02$, $p = 0.93$).

The composite MRI severity score was higher in the WD compared to the EO-PD group ($p < 0.01$) (Table 1). MRI signal in the NL in T2w images was normal in six, hypointense in 12, while T2 hyperintense signal in the putamen was present in 13 WD patients. Out of the group of six WD patients with normal MR signal in NL,

none had NL echogenicity index within the normal range. NL echogenicity index was higher in WD patients presenting compared to those not presenting with T2 hyperintense signal in the putamen (140.4 ± 13.6 vs 106.9 ± 8.2 , $p = 0.03$) while no difference in NL echogenicity index was observed between patients presenting and not presenting T2 hypointense signal in NL (113.2 ± 9.5 vs 124.5 ± 12.1 , $p = 0.70$). T2 hypointense signal in the SN and/or T2 hyperintense signal in the mesencephalic white matter was present in 13 WD patients. In the EO-PD group, NL was rated as hypointense in four patients while hypointense SN was not found in any patient.

4. Discussion

The results of our study confirmed that the NL and SN echogenicity indices examined by digital image analysis of TCS-MRI fusion images are sensitive and specific markers of WD and EO-PD. The hyperechogenicity of SN in the EO-PD group was detected in 93.8% cases, in accordance with previous TCS studies. In the control group slightly increased NL and SN echogenicities were found in about one tenth of subjects without any clinical correlate. This proportion of healthy subjects with SN hyperechogenicity is consistent across studies and their potential risk of developing parkinsonism is discussed [6].

The NL echogenicity index was abnormal in 95.5% of WD patients. Increased echogenicity index of CN in WD patients was less constant than NL hyperechogenicity. Sensitivity and specificity of NL hyperechogenicity were comparable to routinely used screening methods, i.e. serum ceruloplasmin, urinary copper and K-F ring supporting its potential value as a screening examination of WD. Notably, K-F ring was not detectable in 32% of our WD cases in whom diagnosis was confirmed by genetic examination and/or increased liver copper concentration. This finding, which is in line with several recent studies showing that significant proportion of neurological WD patients may lack the K-F ring [3,25,26], advocates the utility of other screening investigations.

SN echogenicity in WD patients was similar as in control subjects, yielding approximately 10% of subjects with hyperechogenicity. This is in contrast to previous studies showing >50% prevalence of SN hyperechogenicity in WD [12,13].

Our finding of normal SN echogenicity in WD patients is surprising since the majority of the WD patients were affected by parkinsonism. Previous studies suggested a link between parkinsonism in WD and variable combination of pre- and postsynaptic damage of the nigrostriatal pathway [27]. Moreover, 13 WD patients had T2 hypointensity in SN and/or T2 hyperintensity in the mesencephalic white matter tracts. These results suggest that, in the case of SN, its microstructural damage depicted on MRI may not invariably affect its echogenicity.

With respect to the echogenicity changes of NL and CN, our results are comparable to two previously published studies [12,13]. The first of the studies found NL hyperechogenicity in 100% of neurological WD patients and a significant correlation between NL hyperechogenicity and clinical severity [12]. The second one found NL hyperechogenicity in 81.6% of neurological WD patients and detected a correlation between SN hyperechogenicity and clinical severity [13].

In contrast to these studies, we did not find any correlation between TCS findings, clinical severity and duration of disease or treatment. Taking these contradictory results into consideration, TCS probably cannot be used as a reliable marker for longitudinal follow-up of chelating therapy or disability prognosis.

There are several factors, which may contribute to disparate SN echogenicity results. For more accurate anatomical delineation of examined structures we used real-time MRI fusion imaging

technology. Although not yet validated in neurological applications, fusion imaging may allow for better identification of brain structures, particularly in oblique imaging planes. Thus, echogenicity indices might be more accurate when using this technique. In addition, we also applied newly developed software for digital analysis of brain structures echogenicity that automatically accounts for the quality of the bone window, different depth, and shades of grey. Its usage eliminates the incorrect manual evaluation of echogenicity and increases sensitivity and comparability [18,23]. Accordingly, sensitivity and specificity for WD and EO-PD differentiation were lower in our cohort when visual analysis of echogenicity was employed.

Although TCS is an easy and cheap examination, it has several limitations. Only one patient (2.6%) from the studied group had to be excluded due to insonability. However, in large population studies insufficient temporal bone window, particularly for NL assessment, is found in more than 10% of subjects [9]. In addition, MRI-TCS fusion with subsequent digital image analysis with duration of 20–30 min is more time consuming compared to standard visual analysis, which may limit its practicability. Further studies should investigate whether similar results can be obtained without MRI-TCS fusion when digital image analysis algorithm would be implemented in the software of routine ultrasound devices. This could decrease the examination duration to 10 min.

Interpretation of TCS findings is hampered by the lack of understanding of neuropathological underpinnings of tissue hyper-echogenicity. The widespread hypothesis suggests its connection with the accumulation of iron and copper. Presumed dependence of tissue echogenicity on iron concentration [28] implies that TCS hyper-echogenicity should correlate with MRI T2/T2* hypointensity, predominantly caused by paramagnetic iron species [29]. Contrary to this assumption, the degree of NL hyper-echogenicity was related to putaminal T2 hyperintensity rather than to T2 hypointensity in NL suggesting that echogenicity is not only determined by iron concentration. In addition, we found NL hyper-echogenicity in all WD patients with normal MR signal in this area confirming previous findings that TCS can bring complementary information to MRI [14,15,30]. The echogenicity changes could be also influenced by copper as documented in a post-mortem study on WD brains showing a correlation between echogenicity and copper concentration in NL [11]. Since MRI cannot reliably depict copper [29], we cannot support nor foreclose its effect on tissue echogenicity in our patients. To sum up, the underpinnings of echogenicity contrast in TCS examination are complex and depend not only on metal accumulation but also on associated pathological microstructural tissue changes.

Despite the limitation of the small number of patients, the sensitivity and specificity of the results are obvious and our findings are in good accordance with previously published studies in PD and WD patients. However, in this proof of concept study we did not examine only *de novo* patients, not all the patients with WD have had isolated parkinsonism, and disease duration was different between groups. Therefore, additional studies with untreated *de novo* patients are needed to confirm the utility of TCS in the differential diagnosis of WD and EO-PD.

With regard to the results above and previously performed studies, we can conclude that TCS findings in WD and EO-PD are potentially helpful as screening biomarkers in early-onset parkinsonism. For the future, it could be efficient to include TCS abnormality into supportive neuroimaging criteria for WD.

Conflict of interest

None of the authors report a conflict of interest with respect to financial or personal relationships with organizations that may

have an influence on this work.

Acknowledgements

This study was supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant no. 15-25602A and Charles University in Prague, PRVOUK P26/LF1/4 and UNCE 204011/12; and RVO-VFN64165.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.04.031>.

References

- [1] P. Dusek, T. Litwin, A. Czlonkowska, Wilson disease and other neurodegenerations with metal accumulations, *Neurol. Clin.* 33 (2015) 175–204.
- [2] P. Ferenci, Pathophysiology and clinical features of Wilson disease, *Metab. Brain Dis.* 19 (2004) 229–239.
- [3] J. Youn, J.S. Kim, H.T. Kim, J.Y. Lee, P.H. Lee, C.S. Ki, J.W. Cho, Characteristics of neurological Wilson's disease without Kayser-Fleischer ring, *J. Neurol. Sci.* 323 (2012) 183–186.
- [4] J. Bennett, S.H. Hahn, Clinical molecular diagnosis of Wilson disease, *Semin. Liver Dis.* 31 (2011) 233–238.
- [5] R. Abdullah, I. Basak, K.S. Patil, G. Alves, J.P. Larsen, S.G. Moller, Parkinson's disease and age: the obvious but largely unexplored link, *Exp. Gerontol.* 68 (2015) 33–38.
- [6] U. Walter, D. Dressler, A. Wolters, M. Wittstock, R. Benecke, Transcranial brain sonography findings in clinical subgroups of idiopathic Parkinson's disease, *Mov. Disord.* 22 (2007) 48–54.
- [7] U. Walter, D. Dressler, T. Probst, A. Wolters, M. Abu-Mugheisib, M. Wittstock, R. Benecke, Transcranial brain sonography findings in discriminating between parkinsonism and idiopathic Parkinson disease, *Arch. Neurol.* 64 (2007) 1635–1640.
- [8] J.M. Hagenah, K. Hedrich, B. Becker, P.P. Pramstaller, G. Seidel, C. Klein, Distinguishing early-onset PD from dopa-responsive dystonia with transcranial sonography, *Neurology* 66 (2006) 1951–1952.
- [9] P. Mahlknecht, K. Seppi, H. Stockner, M. Nocker, C. Scherfler, S. Kiechl, J. Willeit, C. Schmidauer, A. Gasperi, G. Rungger, W. Poewe, Substantia nigra hyper-echogenicity as a marker for Parkinson's disease: a population-based study, *Neurodegener. Dis.* 12 (2013) 212–218.
- [10] D. Berg, S. Behnke, K. Seppi, J. Godau, S. Lerche, P. Mahlknecht, I. Liepelt-Scarfone, C. Pausch, N. Schneider, A. Gaenslen, K. Brockmann, K. Struljies, H. Huber, I. Wurster, H. Stockner, S. Kiechl, J. Willeit, A. Gasperi, K. Fassbender, T. Gasser, W. Poewe, Enlarged hyper-echogenic substantia nigra as a risk marker for Parkinson's disease, *Mov. Disord.* 28 (2013) 216–219.
- [11] U. Walter, M. Skowronska, T. Litwin, G.M. Szpak, K. Jablonka-Salach, D. Skoloudik, E. Bulska, A. Czlonkowska, Lenticular nucleus hyper-echogenicity in Wilson's disease reflects local copper, but not iron accumulation, *J. Neural Transm. Vienna* 121 (2014) 1273–1279.
- [12] U. Walter, K. Krolkowski, B. Tarnacka, R. Benecke, A. Czlonkowska, D. Dressler, Sonographic detection of basal ganglia lesions in asymptomatic and symptomatic Wilson disease, *Neurology* 64 (2005) 1726–1732.
- [13] M. Svetel, M. Mijajlovic, A. Tomic, N. Kresojevic, T. Pekmezovic, V.S. Kostic, Transcranial sonography in Wilson's disease, *Park. Relat. Disord.* 18 (2012) 234–238.
- [14] R. Martinez-Fernandez, N. Caballo, M. Gomez-Choco, MRI and transcranial sonography findings in Wilson's disease, *Mov. Disord.* 28 (2013) 740.
- [15] M.C. Ricciardi, G. Sirimarco, E. Vicenzini, C. Zucco, G. Meco, V. Di Piero, G.L. Lenzi, Transcranial sonographic findings in Wilson disease, *J. Ultrasound Med.* 29 (2010) 1143–1145.
- [16] S. Sinha, A.B. Taly, S. Ravishanker, L.K. Prashanth, K.S. Venugopal, G.R. Arunodaya, M.K. Vasudev, H.S. Swamy, Wilson's disease: cranial MRI observations and clinical correlation, *Neuroradiology* 48 (2006) 613–621.
- [17] S. Schreiber, G. Sakas, V. Kolev, S. Beni, Fusion imaging in neurosonology: clinician's questions, technical potentials and applicability, *Biomed. Eng. Lett.* 4 (2014) 347–354.
- [18] D. Skoloudik, M. Jelinkova, J. Blahuta, P. Cermak, T. Soukup, P. Bartova, K. Langova, R. Herzig, Transcranial sonography of the substantia nigra: digital image analysis, *AJNR – Am. J. Neuroradiol.* 35 (2014) 2273–2278.
- [19] R.J. Wong, R. Gish, M. Schilsky, C. Frenette, A clinical assessment of Wilson disease in patients with concurrent liver disease, *J. Clin. Gastroenterol.* 45 (2011) 267–273.
- [20] A.J. Hughes, S.E. Daniel, L. Kilford, A.J. Lees, Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55 (1992) 181–184.
- [21] B. Leinweber, J.C. Moller, A. Scherag, U. Reuner, P. Gunther, C.J. Lang, H.H. Schmidt, C. Schrader, O. Bandmann, A. Czlonkowska, W.H. Oertel, H. Hefter, Evaluation of the unified Wilson's disease rating scale (UWDRS) in German patients with treated Wilson's disease, *Mov. Disord.* 23 (2008)

Please cite this article in press as: J. Mašková, et al., Comparison of transcranial sonography-magnetic resonance fusion imaging in Wilson's and early-onset Parkinson's diseases, *Parkinsonism and Related Disorders* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.04.031>

- 54–62.
- [22] N.A. Frota, E.R. Barbosa, C.S. Porto, L.T. Lucato, C.R. Ono, C.A. Buchpiguel, P. Caramelli, Cognitive impairment and magnetic resonance imaging correlations in Wilson's disease, *Acta Neurol. Scand.* 127 (2013) 391–398.
- [23] J. Blahuta, T. Soukup, M. Jelinkova, P. Bartova, P. Cermak, R. Herzig, D. Skoloudik, A new program for highly reproducible automatic evaluation of the substantia nigra from transcranial sonographic images, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky, Olomouc Czech Repub.* 158 (2014) 621–627.
- [24] U. Walter, D. Skoloudik, Transcranial sonography (TCS) of brain parenchyma in movement disorders: quality standards, diagnostic applications and novel technologies, *Ultraschall Med.* 35 (2014) 322–331.
- [25] V. Mihaylova, T. Todorov, H. Jeleu, I. Kotsev, L. Angelova, O. Kosseva, G. Georgiev, R. Ganeva, S. Cherninkova, L. Tankova, A. Savov, I. Tournev, Neurological symptoms, genotype-phenotype correlations and ethnic-specific differences in Bulgarian patients with Wilson disease, *Neurologist* 18 (2012) 184–189.
- [26] M. Fenu, M. Liggi, E. Demelia, O. Sorbello, A. Civolani, L. Demelia, Kayser-Fleischer ring in Wilson's disease: a cohort study, *Eur. J. Intern. Med.* 23 (2012) e150–156.
- [27] H. Barthel, W. Hermann, R. Kluge, S. Hesse, D.R. Collingridge, A. Wagner, O. Sabri, Concordant pre- and postsynaptic deficits of dopaminergic neurotransmission in neurologic Wilson disease, *AJNR – Am. J. Neuroradiol.* 24 (2003) 234–238.
- [28] D. Berg, W. Roggendorf, U. Schroder, R. Klein, T. Tatschner, P. Benz, O. Tucha, M. Preier, K.W. Lange, K. Reiners, M. Gerlach, G. Becker, Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury, *Arch. Neurol.* 59 (2002) 999–1005.
- [29] P. Dusek, M. Dezortova, J. Wuerfel, Imaging of iron, *Int. Rev. Neurobiol.* 110 (2013) 195–239.
- [30] W. Hermann, Morphological and functional imaging in neurological and non-neurological Wilson's patients, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1315 (2014) 24–29.

Please cite this article in press as: J. Mašková, et al., Comparison of transcranial sonography-magnetic resonance fusion imaging in Wilson's and early-onset Parkinson's diseases, *Parkinsonism and Related Disorders* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreidis.2016.04.031>



● *Original Contribution*

DIGITIZED IMAGE ANALYSIS OF INSULA ECHOGENICITY DETECTED BY TCS-MR FUSION IMAGING IN WILSON'S AND EARLY-ONSET PARKINSON'S DISEASES

DAVID ŠKOLOUDÍK,^{*,†} JANA MAŠKOVÁ,^{*} PETR DUŠEK,^{*,‡} JIRÍ BLAHUTA,[§] TOMÁŠ SOUKUP,[§]
 ANDREA BURGETOVÁ,[‡] and PETRA BĀRTOVÁ[¶]

^{*} Department of Neurology and Center of Clinical Neuroscience, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic; [†] Department of Neurology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic; [‡] Department of Radiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic; [§] Institute of Computer Science, Faculty of Philosophy and Science, Silesian University in Opava, Opava, Czech Republic; and [¶] Department of Neurology, Ostrava University Medical Faculty and University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

(Received 7 July 2019; revised 2 November 2019; in final form 11 December 2019)

Abstract—Transcranial sonography (TCS) can reveal pathology in brain structures including insula. This study compared insula echogenicity among 22 patients with Wilson's disease (WD), 21 patients with early-onset Parkinson's disease (EO-PD) and 24 healthy patients. Echogenicity of predefined brain structures (insula, lentiform nucleus, caudate nucleus, substantia nigra and raphe nuclei) was evaluated using digitized analysis of TCS fusion imaging with magnetic resonance. Cortical, subcortical and cerebellar atrophy and ventricle diameters were determined from magnetic resonance images. The mean echogenicity index of insula did not differ between males and females ($p=0.92$), but the echogenicity of insula was higher in patients with WD than in patients with EO-PD and healthy patients ($p < 0.05$). The substantia nigra echogenicity was higher in patients with EO-PD, and lentiform nucleus echogenicity was higher in patients with WD ($p < 0.05$). The echogenicity of insula correlated with lentiform nucleus echogenicity ($r=0.75$) but not with age ($r=-0.14$), disease duration ($r=-0.36$), symptom severity ($r=0.28$), cortical ($r=0.11$) nor subcortical ($r=0.05$) atrophy. (E-mail: skoloudik@hotmail.com) © 2019 World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology. All rights reserved.

Key Words: Wilson's disease, Parkinson's disease, Transcranial sonography, Magnetic resonance, Echogenicity.

INTRODUCTION

Transcranial sonography (TCS) is a useful tool for detecting pathologies of the brain parenchyma based on changes in echogenicity in brain structures including substantia nigra (SN), brainstem raphe, caudate nucleus, lentiform nucleus (LN), or dentate nucleus (Walter and Školoudík 2014). This can aid in the diagnosis of and differentiation among brain diseases such as Parkinson's disease (PD) and other Parkinsonian syndromes, dystonia, depression, panic disorder, Wilson's disease (WD) and Huntington disease (Walter et al. 2007; Berg et al. 2008; Walter and Školoudík 2014). However, TCS has lower spatial resolution than other neuroimaging methods such as computed tomography (CT) or magnetic

resonance (MR). It is also limited by the quality of the bone window and is dependent on sonographer skills (Školoudík and Walter 2010; Walter and Školoudík 2014).

These drawbacks can be overcome by fusion imaging (with MR or CT) using Virtual Navigator and digitized image analysis (Blahuta et al. 2011, 2014; Laganá et al. 2011, 2013; Forzoni et al. 2012; Školoudík et al. 2014), which has not only improved the assessment of visually detectable structures on TCS images but has also enabled evaluation of the echogenicity of other brain structures such as insula, which can be segmented only with the aid of a fused MR image (Školoudík et al. 2016). An earlier study has shown that the echogenicity of insula can be reliably measured with low intra- and inter-rater variability by TCS-MR fusion imaging (Školoudík et al. 2016). However, there have been no studies to date assessing the echogenicity of insula in various diseases.

Address correspondence to: Prof. David Školoudík, MD, PhD, FESO, FEAN, Department of Neurology, University Hospital Ostrava, 17. listopadu 1790/5, CZ-70852 Ostrava, Czech Republic. E-mail: skoloudik@hotmail.com

Accumulation of iron, manganese, copper, or other substrates; neuronal loss; gliosis; and other structural changes can cause variations in the echogenicity of brain parenchyma (Berg et al. 1999; Behnke et al. 2009; Walter et al. 2014; Walter and Školoudík 2014; Ghassaban et al. 2019). However, pathologic processes leading to changes in the echogenicity of various brain structures are not fully understood.

PD and WD are characterized by increases in echogenicity of particular brain structures that are detectable by TCS—for example, an increased SN echogenicity in PD and hyperechogenic LN in WD resulting from cerebral accumulation of metals leading to brain parenchymal damage (Berg et al. 1999; Behnke et al. 2009; Walter et al. 2014; Walter and Školoudík 2014; Yu et al. 2018). Thus, LN and SN echogenicity can serve as sensitive diagnostic markers in these disorders (Berg et al. 1999; Behnke et al. 2009; Mijajlovic et al. 2014; Walter et al. 2014; Walter and Školoudík 2014; Yu et al. 2018).

In this study, we compared insula echogenicity among patients with WD and patients with early-onset (EO)-PD and healthy patients by TCS-MR fusion imaging, using Virtual Navigator and digitized image analysis. We also carried out an exploratory correlation analysis to identify clinical and imaging factors associated with the echogenicity of insula.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Data for this study were acquired during the same session on the same patients (22 patients with WD and 16 patients with early-onset Parkinson's disease (EO-PD) as in our earlier TCS study (Mašková et al. 2016), although 1 patient with WD and 7 additional patients with EO-PD were included. Inclusion criteria were a neurologic form of WD with a diagnosis established according to Leipzig criteria for the WD group, and diagnosis according to the UK Parkinson's Disease Society Brain Bank criteria and age at onset ≤ 40 y for the EO-PD group. The control group had 24 healthy patients with no neuropsychiatric disorders. For all groups, an insufficient temporal bone window for TCS examination was an exclusion criterion. All patients provided written, informed consent before their participation in the study, and the study protocol was approved by the Ethical Committee of the General Teaching Hospital in Prague, Czech Republic.

Neurologic impairment was assessed using the Unified Wilson's Disease Rating Scale (UWDRS) in patients with WD and using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale, Part III (UPDRS III) in patients with EO-PD. Patients were examined while receiving their usual symptomatic therapy.

MR imaging

MR images were acquired using a 1.5 T whole-body Achieva scanner (Philips, Eindhoven, The Netherlands). Standard spin echo T1 w (spatial resolution = $1.2 \times 1.2 \times 3$ mm³, echo time (TE) = 15 ms, repetition time (TR) = 500 ms) and T2 w (spatial resolution = $0.5 \times 0.5 \times 2$ mm³, TE = 233 ms, TR = 2250 ms) sequences covering the entire brain were used to quantify brain damage and generate anatomic images for TCS fusion. The insular cortex was clearly depicted in the axial T2 w sequences in 6–8 voxels in the latero-lateral direction and 10 slices (expected thickness 3–4 mm and extends >20 mm in rostro-caudal direction). The degree of brain atrophy on MR images was visually graded as absent (0 points), mild (1 point), or severe (2 points) in the following 3 locations: (i) cerebellum and brainstem, (ii) basal ganglia and subcortical region and (iii) cortex. The grading was carried out by an experienced neuroradiologist blinded to patients' diagnosis. Measurement of the third ventricle width was performed in the axial T2-weighted images in the middle of the anterior-posterior direction where the largest width of the ventricle was measured. Measurement of the fourth ventricle width was performed in the axial T2-weighted images in the largest width of the ventricle. All measurements were performed using the scanner software.

Transcranial sonography

The ultrasound system was equipped with the Virtual Navigation (Esaote S.p.A., Genoa, Italy, and MedCom GmbH, Darmstadt, Germany) option, which allows real-time image fusion of TCS and MR images. The ultrasound scanner Esaote MyLab Twice (Esaote S.p.A.) with a 2.5-MHz phased-array transducer (PA240), 639-039 CIVCO Reusable Tracking Bracket (CIVCO, Kalona, IA, USA) and sensor mount was used. Virtual Navigator procedures were implemented using an electromagnetic tracking system composed of a transmitter and a small receiver mounted on the ultrasound probe. The transmitter position—considered as the basis of the reference system—was fixed through a support, and the receiver provided the position and orientation of the ultrasound probe in relation to the transmitter. A proper head support was also used to keep the subject's head as steady as possible. Patients were examined in the supine position on a horizontal bed with 0° tilt.

After uploading the MR images in Digital Imaging and Communications in Medicine format to the Virtual Navigator, eight facial markers were used in all patients for fusion imaging and visualization of brain structures. Three internal markers were then used for a fine tuning to obtain a proper fusion. Transverse TCS images and corresponding MR images of the insula in the axial thalamic plane were acquired using both left and right trans-temporal approaches (Fig. 1).

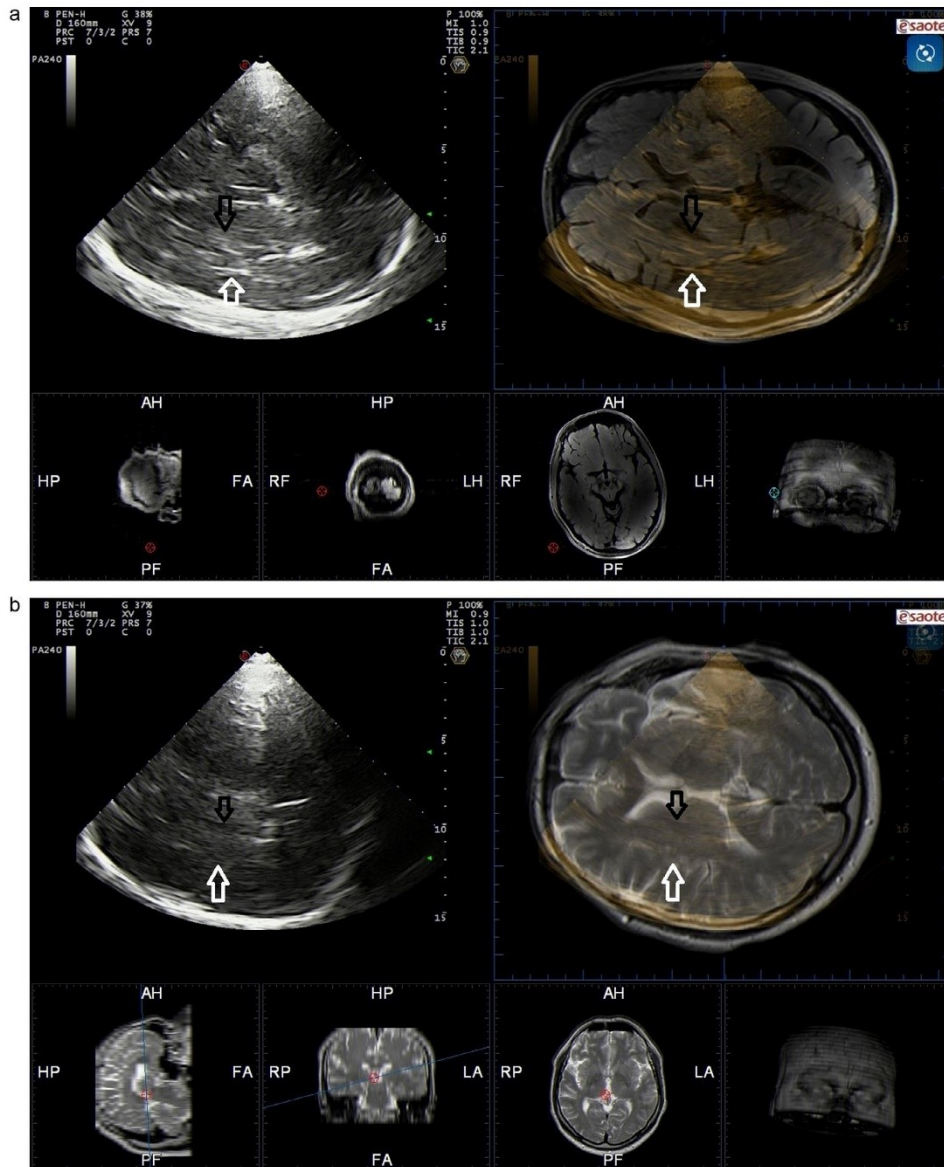


Fig. 1. Fusion imaging of transcranial sonography and magnetic resonance in the thalamic plane. (a) Increased echogenicity of lentiform nucleus and insula in patient with Wilson's disease. (b) Normal echogenicity of lentiform nucleus and insula in patient with early onset Parkinson's disease.

The examination was performed through both the right and left temporal bone window with the following parameters: a penetration depth of 16 cm, high penetration, dynamic range = 7 (50 dB), frequency = 1–4 MHz, enhancement = 3, density = 2, view = 9, persistence = 7, dynamic compression = 0, gain = 36%, gray map = 0, S view off, two focuses at 5 and 10 cm, mechanical index = 0.9 and the following tissue indices: thermal index for soft tissue = 1.0, thermal index for bone = 1.0 and thermal index for cranial bone 2.1. The TCS examination of all patients were performed with the exact same settings.

All images were saved in Digital Imaging and Communications in Medicine format. The B-Mode Assist tool and specific elliptical regions of interest were used for the measurement of echogenicity index of insula (area: 196 mm²), SN (area: 50 mm²), LN (area: 200 mm²), caudate nucleus (area: 140 mm²) and raphe nuclei (area: 40 mm²) (Blahuta et al. 2014; Školoudík et al. 2014, 2016; Šilhán et al. 2015; Mašková et al. 2016). The higher of the 2 measured values for each structure was used for the analysis. The reproducibility of the insula echogenicity index measurement was calculated in an earlier study and reached intra-rater/inter-rater intra-class correlation coefficients of 0.995 (95% confidence interval [CI]: 0.993–0.997) / 0.937 (95% CI: 0.910–0.956) and Spearman's rank correlation coefficients of $r = 0.993$ / $r = 0.921$, respectively (Školoudík et al. 2016). The sonographer (D.Š.) was blinded to the patients' diagnosis but not to their movement disorder symptoms.

Statistics

The sample size of the study was based on an expected 30% difference in the echogenicity index of insula between groups. Pre-study calculations showed that a minimum of 23 patients in each group were needed to be screened to the study to reach a statistically significant difference with an α value of 0.05 (two-tailed) and β value of 0.8 (21 patients in each group), assuming that 10% of these patients (2

patients) would be excluded because of an insufficient bone window.

The Shapiro-Wilk test was used for normality testing. Data with a normal distribution are reported as mean \pm standard deviation. Non-normally distributed variables are presented as a mean, median and interquartile range. Comparisons between two groups were performed with the Mann-Whitney U test. The Kruskal-Wallis test was used for comparison among three groups followed by Bonferroni multiple comparison test comparing all pairs. Differences among the WD, EO-PD and control groups were evaluated by one-way analysis of variance.

The dependence of variables was assessed using the Spearman's correlation coefficient. Bilateral measurements of insula, substantia nigra, caudate nucleus and LN were used for statistical evaluation. All reported p values are two-tailed. All tests were carried out at an α level of significance of 0.05. Data were analyzed using SPSS v.22.0 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

RESULTS

Of the 70 patients screened for the study (23 patients with WD and 23 patients with EO-PD and 24 healthy controls), 3 (1 patient with WD and 2 patients with EO-PD) were excluded from analysis because of an insufficient bone window. Demographic and medical data of patients included in the analysis are presented in Table I. The mean echogenicity index of insula did not differ significantly between males and females (79.99 ± 29.07 vs. 80.78 ± 32.81 ; $p = 0.919$).

Echogenicity of insula was higher in patients with WD (103.92 ± 34.94) compared with patients with EO-PD (73.64 ± 15.70 ; $p = 0.030$) and healthy controls (64.82 ± 24.60 ; $p < 0.001$) (Table II and Fig. 1). Also, LN and CN echogenicity indices were higher in patients with WD (109.10 ± 36.30 and 48.70 ± 21.00) compared with patients with EO-PD (62.60 ± 8.62 , $p < 0.001$ and 39.52 ± 7.32 ; $p = 0.010$) and healthy controls (54.60 ± 14.06 ; $p < 0.001$ and 33.11 ± 8.78 ; $p < 0.001$),

Table I. Demography, clinical and transcranial sonographic findings

	WD patients	EO-PD patients	Control
Number of enrolled patients (males)	22 (11)	21 (10)	24 (8)
Age; mean \pm SD (y)	43.8 \pm 8.5	42.0 \pm 4.5	37.6 \pm 10.1
Duration of disease; mean \pm SD (y)	17.2 \pm 8.0	7.6 \pm 4.8	NA
Duration of therapy; mean \pm SD (y)	13.5 \pm 7.2	3.6 \pm 1.7	NA
UPDRS-III subscore; mean; median (interquartile range)	NA	21.3; 16.0 (12.0–32.0)	NA
UWDRS neurologic subscore; mean; median (interquartile range)	19.6; 13.5 (7.0–30.5)	NA	NA
L-DOPA equivalent; mean \pm SD (mg)	NA	623.4 \pm 453.2	NA
Number of patients on d-PEN/Zinc/combination treatment	7/8/4	NA	NA

d-PEN = d-penicillamine, EO-PD = early-onset Parkinson's disease, MRI = magnetic resonance imaging, SD = standard deviation, UPDRS-III = Unified Parkinson's Disease Rating Scale, Part III, UWDRS = Unified Wilson's Disease Rating Scale, WD = Wilson disease.

Table II. Transcranial sonography and magnetic resonance findings in WD, EO-PD and healthy controls

	WD patients (22 patients)	<i>p</i> value (WD versus EO-PD)	EO-PD patients (21 patients)	<i>p</i> value (EO-PD versus controls)	Controls (24 patients)	<i>p</i> value (WD versus controls)
Transcranial sonography						
Insula echogenicity index; mean ± SD	103.92 ± 34.94	0.030	73.64 ± 15.70	0.379	64.82 ± 24.60	<0.001
Hyperechogenic insula (>99th percentile in gen- eral population); <i>n</i> (%)	16 (72.7 %)	<0.001	1 (4.76 %)	0.984	1 (4.17 %)	<0.001
SN echogenicity index; mean ± SD	27.38 ± 5.60	<0.001	38.01 ± 8.65	<0.001	29.47 ± 5.27	0.475
Hyperechogenic SN (>90th percentile of general pop- ulation); <i>n</i> (%)	3 (13.6 %)	<0.001	17 (81.0 %)	<0.001	2 (8.3 %)	0.741
LN echogenicity index; mean ± SD	109.10 ± 36.30	<0.001	62.60 ± 8.62	0.993	54.60 ± 14.06	<0.001
Hyperechogenic LN (>99th percentile in general pop- ulation); <i>n</i> (%)	17 (77.3 %)	<0.001	0 (0 %)	1.000	0 (0 %)	<0.001
CN echogenicity index; mean ± SD	48.70 ± 21.00	0.010	39.52 ± 7.32	0.440	33.11 ± 8.78	<0.001
Hyperechogenic CN (>99th percentile in general pop- ulation); <i>n</i> (%)	6 (27.3 %)	0.124	0 (0 %)	1.000	0 (0 %)	0.112
BR echogenicity index; mean ± SD	28.74 ± 4.92	0.531	31.67 ± 5.06	0.894	30.12 ± 5.12	0.697
Hypoechoic BR (<fifth percentile in general pop- ulation); <i>n</i> (%)	1 (4.5 %)	1.000	1 (4.8 %)	0.849	2 (8.3 %)	0.834
	Magnetic resonance					
Third ventricle width; mean ± SD	7.84 ± 2.70	0.016	3.98 ± 1.37	1.000	2.94 ± 0.54	0.002
Fourth ventricle width; mean ± SD	2.11 ± 0.52	0.563	2.00 ± 0.43	0.388	1.86 ± 0.23	0.168
Cortical atrophy - absent / mild / severe; <i>n</i> (%)	9(40.9)/7(31.8)/6(27.3)	0.667	7(33.3)/13(61.9)/1(4.8)	<0.001	24(100)/0(0)/0(0)	<0.001
Subcortical atrophy - absent / mild / severe; <i>n</i> (%)	6(27.2)/8(36.4)/8(36.4)	0.105	10(47.6)/8(38.1)/3(14.3)	<0.001	24(100)/0(0)/0(0)	<0.001
Cerebellar atrophy - absent / mild / severe; <i>n</i> (%)	4(18.2)/11(50.0)/7(31.8)	0.051	9(42.9)/9(42.9)/3(14.2)	<0.001	24(100)/0(0)/0(0)	<0.001

BR = brainstem raphe, CN = caudate nucleus, EO-PD = early-onset Parkinson's disease, LN = lentiform nucleus, SN = substantia nigra, WD = Wilson disease.

respectively. SN echogenicity index was higher in patients with EO-PD (38.01 ± 8.65) compared with patients with WD (27.38 ± 5.60 ; $p < 0.001$) and healthy controls (29.47 ± 5.27 ; $p < 0.001$) (Table II).

The width of the third ventricle was larger in patients with WD (7.84 ± 2.70 mm) compared with patients with EO-PD (3.98 ± 1.37 mm; $p = 0.016$) and healthy patients (2.94 ± 0.54 mm; $p = 0.002$) (Table II). Signs of cortical, subcortical and cerebellar atrophy on MR were significantly less frequent in healthy controls ($p < 0.001$ in all cases), but no significant differences were found between EO-PD and WD patients ($p = 0.667$, $p = 0.105$ and $p = 0.051$) (Table II). There were no correlations between echogenicity index of insula and age or NR echogenicity index, or between echogenicity of insula and width of third or fourth ventricle (Table III).

In patients with WD, the echogenicity index of insula was correlated with LN echogenicity index but not with age, disease duration, or symptom severity as assessed with the UWDRS. In patients with PD, there was no correlation among the echogenicity index of insula and any of the evaluated parameters (Table III).

DISCUSSION

The results of this study show that WD and EO-PD patients differ not only in terms of echogenicity of SN and LN but also in that of insula. Patients with WD exhibited increased echogenicity of both LN and insula compared with patients with EO-PD and healthy controls. Moreover, a strong positive correlation was

Table III. Correlation between echogenicity index of insula and selected parameters

		Echogenicity index of insula	
		Spearman correlation coefficient <i>r</i>	<i>p</i> value
All patients	Age	-0.01341	0.91423
	BR echogenicity index	-0.23556	0.05499
PD patients	Age	-0.13385	0.56296
	Disease duration	0.0595	0.79781
	UPDRS-III	-0.0883	0.74504
	SN echogenicity index	0.06623	0.77545
	Third ventricle width	-0.12602	0.58622
	Fourth ventricle width	0.28106	0.21714
	Cortical atrophy	-0.19645	0.39339
WD patients	Subcortical atrophy	0.18464	0.42300
	Age	-0.13834	0.53924
	Disease duration	-0.36091	0.09891
	UWDRS	0.27922	0.20824
	LN echogenicity index	0.74816	0.00006
	CN echogenicity index	0.2716	0.22145
	Third ventricle width	0.07064	0.75475
	Fourth ventricle width	0.12415	0.58200
Cortical atrophy	0.11762	0.60216	
Subcortical atrophy	0.05641	0.8031	

BR = brainstem raphe, CN = caudate nucleus, EO-PD = early-onset Parkinson's disease, LN = lentiform nucleus, SN = substantia nigra, UPDRS-III = the Unified Parkinson's Disease Rating Scale, Part III, UWDRS = the Unified Wilson's Disease Rating Scale, WD = Wilson's disease.

observed between the echogenicity of the two structures. These results confirm that insula echogenicity is a useful diagnostic marker for differentiating between WD and EO-PD.

The reason for the increased/decreased echogenicity of various brain structures in neurodegenerative diseases is not fully understood. Studies have shown that the accumulation of metals associated with neurodegeneration—for example, iron in PD (Berg et al. 1999; Behnke et al. 2009; Yu et al. 2018; Ghassaban et al. 2019), copper in WD (Walter et al. 2014), manganese in dystonia (Walter 2010), or calcification (Stenc Bradvica 2013)—may contribute to the increased echogenicity of brain parenchyma. On the contrary, decreased echogenicity of raphe nuclei may be attributable to neuronal loss in the central brainstem (Šilhán et al. 2015). In addition, other pathologic processes, such as focal brain atrophy (e.g., medial temporal lobe in dementia) (Yilmaz et al. 2017) or pathologic intracranial processes (e.g., tumor or hemorrhage) (Bogdahn et al. 1998; Školoudík 2017), can also lead to changes in brain parenchyma echogenicity.

The reason for increased insula echogenicity in patients with WD in our study is unclear; however, it is possible that copper or iron accumulation, structural changes associated with neuronal loss, gliosis and insular atrophy play a role. The strong correlation between insula and LN echogenicity suggests that the same

pathologic process underlies the hyperechogenicity of the two structures.

A postmortem study showed that LN hyperechogenicity is correlated with putaminal copper but not iron concentration (Walter et al. 2014). Thus, copper accumulation and associated pathologic processes could lead to hyperechogenicity in both the LN and insula, although histopathologic analyses are needed to confirm this possibility.

Cortical and subcortical atrophy is another factor that could increase insula echogenicity. These were more frequently detected in patients with WD than in patients with EO-PD and healthy controls by MR. However, visually assessed cortical and subcortical atrophy were not correlated with insula echogenicity. Thus, the contribution of brain atrophy and accumulation of metals to insula echogenicity requires further quantitative magnetic resonance imaging study with volumetric analysis and a technique sensitive to metal deposits such as quantitative susceptibility mapping.

This study had several limitations. First, the number of patients was calculated only to evaluate differences in insula echogenicity between WD and PD patients and healthy controls; the influence of additional factors such as age, sex, disease stage, brain atrophy, or other brain pathologies on insula echogenicity remains to be determined. Second, the sensitivity and specificity of insula hyperechogenicity in diagnosing WD and differentiating between WD and EO-PD must be assessed using a larger number of treatment-naïve patients. Third, all TCS examinations were performed by only one highly experienced sonographer. Thus, the inter-investigator variability was not able to be evaluated. Moreover, the sonographer was not blinded to patients' movement disorder symptoms. Fourth, consistency and any variations along the planes within a group or across the groups were not tested. Last, serial TCS examinations should be performed to analyze the dynamics of insula echogenicity during the course of disease.

In conclusion, increased insula echogenicity in patients with WD compared with patients with PD and healthy controls was detected by TCS-MR fusion imaging. A strong positive correlation was observed between insula and LN echogenicity in patients with WD. Our findings indicate that insula echogenicity is a promising biomarker for WD.

Acknowledgments—The study was supported by Ministry of Health of the Czech Republic (grant number 15-25602 A), Charles University (Project PROGRES Q27/LF1) and IT4 Innovations Excellence in Science LQ1601.

Conflict of Interest disclosure—None of the authors report a conflict of interest with respect to financial or personal relationships with organizations that may have an influence on this work.

REFERENCES

- Behnke S, Schroeder U, Dillmann U, Buchholz HG, Schreckenberger M, Fuss G, Reith W, Berg D, Krick CM. Hyperechogenicity of the substantia nigra in healthy controls is related to MRI changes and to neuronal loss as determined by F-Dopa PET. *Neuroimage* 2009;47:1237–1243.
- Berg D, Godau J, Walter U. Transcranial sonography in movement disorders. *Lancet Neurol* 2008;7:1044–1055.
- Berg D, Grote C, Rausch WD, Mäurer M, Wesemann W, Riederer P, Becker G. Iron accumulation in the substantia nigra in rats visualized by ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1999;25:901–904.
- Blahuta J, Soukup T, Čermák P. Image processing of medical diagnostic neurosonographical images in MATLAB. recent researches in computer science. Proceedings of the 15th World Scientific and Engineering Academy and Society Circuits, Systems, Communications, and Computers Multiconference. : World Scientific and Engineering Academy and Society; 2011. p. 85–90.
- Blahuta J, Soukup T, Jelínková M, Bártová P, Čermák P, Herzig R, Školouđík D. A new program for highly reproducible automatic evaluation of the substantia nigra from transcranial sonographic images. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2014;158:621–627.
- Bogdahn U, Becker G, Schlachetzki F. Echoenhancers and transcranial color duplex sonography. 1st ed. Berlin: Blackwell Science Inc; 1998.
- Forzoni L, D'Onofrio S, De Beni S, Laganà MM, Školouđík D, Baselli G, Nascente ISM. Virtual navigator registration procedure for transcranial application. In: Hellmich C, Hamza MH, Simek D, (eds). Proceedings of the IASTED International Conference Biomedical Engineering (BioMed 2012). Innsbruck, Austria. : International Association of Science and Technology for Development (IASTED); 2012. p. 496–503.
- Ghassaban K, He N, Sethi SK, Huang P, Chen S, Yan F, Haacke EM. Regional high iron in substantia nigra differentiates Parkinson's disease patients from healthy controls. *Front Aging Neurosci* 2019;11:106.
- Laganà MM, Forzoni L, Viotti S, De Beni S, Baselli G, Cecconi P. Assessment of the cerebral venous system from the transcondylar ultrasound window using Virtual Navigator technology and MRI. In: Proceedings of 33rd Annual International Conference of the IEEE EMBS, Piscataway, NJ. : IEEE; 2011. p. 579–582.
- Laganà MM, Preti MG, Forzoni L, D'Onofrio S, De Beni S, Barberio A, Cecconi P, Baselli G. Transcranial ultrasound and magnetic resonance image fusion with Virtual Navigator. *IEEE T Multimedia* 2013;15:1039–1048.
- Mašková J, Školouđík D, Burgetová A, Fiala O, Brůha R, Záhorská D, Serranová T, Slovák M, Ulmanová O, Růžicka E, Dušek P. Comparison of transcranial sonography-magnetic resonance fusion imaging in Wilson's and early-onset Parkinson's diseases. *Parkinsonism Relat Disord* 2016;28:87–93.
- Mijajlović MD, Tsivgoulis G, Sternic N. Transcranial brain parenchymal sonography in neurodegenerative and psychiatric diseases. *J Ultrasound Med* 2014;33:2061–2068.
- Šilhán P, Jelínková M, Walter U, Pavlov Praško J, Herzig R, Langová K, Školouđík D. Transcranial sonography of brainstem structures in panic disorder. *Psychiatry Res* 2015;234:137–143.
- Školouđík D. Using transcranial sonography to display intracranial structures in the B-mode. *Cesk Slov Neurol N* 2017;80/113: 8–23.
- Školouđík D, Bártová P, Mašková J, Dušek P, Blahuta J, Langová K, Walter U, Herzig R. Transcranial sonography of the insula: Digitized image analysis of fusion images with magnetic resonance. *Ultraschall Med* 2016;37:604–608.
- Školouđík D, Jelínková M, Blahuta J, Čermák P, Soukup T, Bártová P, Langová K, Herzig R. Transcranial sonography of the substantia nigra: Digital image analysis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2014;35: 2273–2278.
- Školouđík D, Walter U. Method and validity of transcranial sonography in movement disorders. *Int Rev Neurobiol* 2010;90:7–34.
- Stenc Bradvica I, Jančuljak D, Butković-Soldo S, Mihaljević I, Vladetić M, Bradvica M. Clinical manifestation and neuroimaging methods in diagnosing basal ganglia calcifications. *Med Glas (Zenica)* 2013;10:154–157.
- Walter U. Transcranial sonography in brain disorders with trace metal accumulation. *Int Rev Neurobiol* 2010;90:166–178.
- Walter U, Behnke S, Eyding J, Niehaus L, Postert T, Seidel G, Berg D. Transcranial brain parenchyma sonography in movement disorders: State of the art. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:15–25.
- Walter U, Školouđík D. Transcranial sonography of brain parenchyma in movement disorders: Quality standards, diagnostic applications and novel technologies. *Ultraschall Med* 2014;35:322–331.
- Walter U, Skowrońska M, Litwin T, Szpak GM, Jablonka-Salach K, Školouđík D, Bulska E, Czlonkowska A. Lenticular nucleus hyperechogenicity in Wilson's disease reflects local copper, but not iron accumulation. *J Neural Transm* 2014;121:1273–1279.
- Yilmaz R, Pilotto A, Roeben B, Preische O, Suenkel U, Heinzel S, Metzger FG, Laske C, Maetzler W, Berg D. Structural ultrasound of the medial temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ultraschall Med* 2017;38:294–300.
- Yu SY, Cao CJ, Zuo LJ, Chen ZJ, Lian TH, Wang F, Hu Y, Piao YS, Li LX, Guo P, Liu L, Yu QJ, Wang RD, Chan P, Chen SD, Wang XM, Zhang W. Clinical features and dysfunctions of iron metabolism in Parkinson disease patients with hyper echogenicity in substantia nigra: A cross-sectional study. *BMC Neurol* 2018;18:9.

Abstract

Objectives: Hyperechogenicity of the substantia nigra (SN) and abnormal dopamine transporter-single-photon emission computed tomography (DAT-SPECT) are biomarkers commonly used in the assessment of prodromal synucleinopathy. Our goal was: 1) to compare echogenicity of SN in idiopathic REM behavior disorder (iRBD), PD without RBD (PD-noRBD), PD with RBD (PD+RBD), and control subjects, and 2) to examine association between SN degeneration assessed by DAT-SPECT and SN echogenicity.

Patients/Methods: Sixty-one subjects with confirmed iRBD were examined using Movement Disorders Society-unified PD rating scale (MDS-UPDRS), TCS (transcranial sonography) and DAT-SPECT. The results were compared with 44 patients with PD (25% PD+RBD) and with 120 age-matched healthy subjects.

Results and conclusion: The abnormal SN area was found in 75.5% PD, 23% iRBD and 7.3% controls. Median SN echogenicity area in PD ($0.27 \pm 0.22 \text{ cm}^2$) was higher compared to iRBD ($0.07 \pm 0.07 \text{ cm}^2$; $p < 0.0001$) and controls ($0.05 \pm 0.03 \text{ cm}^2$; $p < 0.0001$). SN echogenicity in PD+RBD was not significantly different from PD-noRBD (0.30 vs. 0.22, $p = 0.15$).

Abnormal DAT-SPECT was found in 16 iRBD (25.4%) and 44 PD subjects (100%). No correlation between the larger SN area and corresponding putaminal binding index was found in iRBD ($r = -0.13$, $p = 0.29$), nor in PD ($r = -0.19$, $p = 0.22$).

The results of our study showed that: 1) SN echogenicity area in iRBD was higher compared to controls, but the hyperechogenicity was present only in a minority of iRBD; 2) SN echogenicity and DAT-SPECT binding index did not correlate in either group; and 3) SN echogenicity does not differ between PD with/without RBD.

Keywords: transcranial sonography, idiopathic rapid-eye-movement sleep behavior disorder, Parkinson's disease, dopamine transporter imaging, neuroimaging, substantia nigra hyperechogenicity

1. Introduction

Idiopathic rapid eye movement behavior disease (iRBD) is a disorder manifesting with typical dream-enacting behaviors and lack of atonia during REM sleep; it is recognized as prodromal phase of synucleinopathies¹⁻³ such as Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB)^{4, 5}, or multiple system atrophy (MSA). In contrast with previous works declaring average risk of conversion to manifest neurodegenerative phenotype between 38-68%⁶⁻⁸, the recently published longitudinal studies revealed significant correlation between duration of follow-up and conversion rate⁹ which exceeds 90% within 14 years since the first iRBD symptoms¹⁰⁻¹². Additionally, in subjects presenting with other risk factors such as cognitive deficit, olfactory dysfunction, or abnormal findings in dopamine transporter-single-photon emission computed tomography imaging (DAT-SPECT), the phenoconversion rate is much higher¹³.

DAT imaging is the gold standard for evaluating SN dopaminergic neuronal loss in prodromal and manifest synucleinopathies¹⁴. Gradual decrease in DAT binding observed in physiological aging (approximately 6-7% per decade) is accelerated in PD patients reaching 6-13% annual loss^{14, 15}. Decrease below 65% of age-expected binding ratio was confirmed as a risk factor for the development of PD in elderly population¹³. The loss of DAT binding necessary for the clinical manifestation of parkinsonism is not exactly determined and the estimated threshold ranges from 50% to 80%^{14, 16, 17}. Reduced striatal DAT binding in PD was associated with motor severity, mostly with bradykinesia and rigidity¹⁸.

DAT imaging in iRBD is a useful marker for determination of short-term risk of conversion to manifest synucleinopathy⁶. However, it has been shown that a combination with other markers is required to achieve satisfactory predictive performance of the test towards conversion, e.g. inclusion of SN hyperechogenicity, which increases the sensitivity for conversion risk over 2.5 years to 100%⁶. Transcranial sonography (TCS) has been established as a specific and sensitive diagnostic tool for distinguishing PD patients from healthy subjects, achieving high specificity (83-87%) and sensitivity (93-100%)^{19, 20}. Large SN hyperechogenic area, which is typically found in PD patients, is also consistently described in about 10% of the healthy population²¹⁻²³. The presence of TCS SN hyperechogenicity is not associated with sex, or duration of clinical symptoms in PD and other synucleinopathies^{7, 24-30}. The previously reported age-independence of SN echogenicity changes³¹⁻³³ has been, however, re-evaluated and questioned in recent studies^{34, 35}.

The SN hyperechogenicity has been observed in iRBD subjects, although with a lower prevalence compared to PD^{7, 26, 36, 37}. However, the results of previous studies evaluating TCS changes in iRBD are not entirely consistent: 1) reported average SN echogenicity area showed a wide range of values (0,16-0,28 cm² in iRBD and 0,06-0,176 cm² in healthy subjects) and 2) the percentage of abnormal TCS findings varies in both groups (34-63% iRBD and 10-29% controls)^{7, 36, 38-42}.

Interestingly, iRBD patients do not reach the same extent of SN echogenicity area as is seen in PD, even after phenoconversion; this observation triggered birth of the theory postulating different

mechanism of SN degeneration in PD with and without RBD³⁷. Clinically, RBD is a marker of “diffuse malignant subtype” of synucleinopathies associated with a higher incidence of dementia, gait disturbance, and orthostasis^{43, 44}. PD patients with RBD tend to have more severe SN dopaminergic loss on DAT-SPECT⁴⁵, however, it is not clear whether they also possess specific TCS signature.

Although both, TCS and DAT-SPECT, depict degeneration of SN, their longitudinal dynamics vary considerably. While the loss of dopaminergic neurons assessed by DAT-SPECT is progressive in time, the sonography studies have not shown dependence on the duration of the disease and the SN echogenicity changes in PD remain stationary over time⁴⁶. Most of published studies documented no association between decreased striatal DAT uptake and SN hyperechogenicity in PD patients^{18, 47}, thus, they are considered as independent and complementary markers of SN damage^{18, 38, 48}.

Motivated by the knowledge gap regarding association between RBD status and TCS findings in synucleinopathies, the aims of our study were 1) to compare echogenicity of SN in control subjects, iRBD, PD without RBD (PD-noRBD), and PD with RBD (PD+RBD); 2) to examine association between SN degeneration assessed by DAT-SPECT and SN echogenicity; and 3) investigate association between SN echogenicity area and clinical severity of motor symptoms.

2. METHODS

2.1. Patients

Sixty-one subjects with iRBD (57M/4F, mean age 66.4±8.1) diagnosed according to the American Academy of Sleep Medicine ICSD-3 (International Classification of Sleep Disorders, 3rd ed, Darien, IL 2014) were included. For inclusion, all patients had to be without overt parkinsonism, dementia, factors indicative of secondary RBD such as narcolepsy, drug-induced RBD (i.e. RBD originating shortly after initiation of antidepressants), or focal brainstem lesions on MRI.

Forty-four treatment-naïve PD patients newly diagnosed in accordance with the MDS clinical diagnostic criteria^{49, 50} (31M/13F, mean age 56.3±12.4 years) were included. All iRBD and PD patients were examined by a single-night polysomnography, the Movement Disorders Society-sponsored revision of the Unified PD Rating Scale (MDS-UPDRS)⁵¹, TCS and DAT-SPECT. The PD group was divided into subgroups without (PD-noRBD) and with (PD+RBD) RBD according to the results of the polysomnographic examination using identical criteria as in the iRBD group. Clinical and MDS-UPDRS examination was performed by an experienced movement disorders specialist (PD, ER, VI).

The control group for TSC examination consisted of 120 healthy subjects (76M/44F, mean age 55.5±12.2 years) without history of neurological or psychiatric disorders. In all groups, only subjects with bilaterally permeable temporal bone window were included. All subjects signed informed consent and the study was approved by the Ethical Committee of General University Hospital in Prague.

2.2. Transcranial sonography (TCS)

In our study we used a commercial ultrasound device (Toshiba, Aplio 300) with a 2.5MHz phased array transducer. The ultrasound examination was performed through the right and left preauricular temporal bone windows with the commonly used parameters (penetration depth 16 cm, dynamic range 50 dB). The butterfly-shaped mesencephalic brainstem and the region of SN in mesencephalic section (Fig.1 A,B) were evaluated from the transverse plane. For accurate comparison, all TCS examinations were performed with the same settings without gain adjustment.

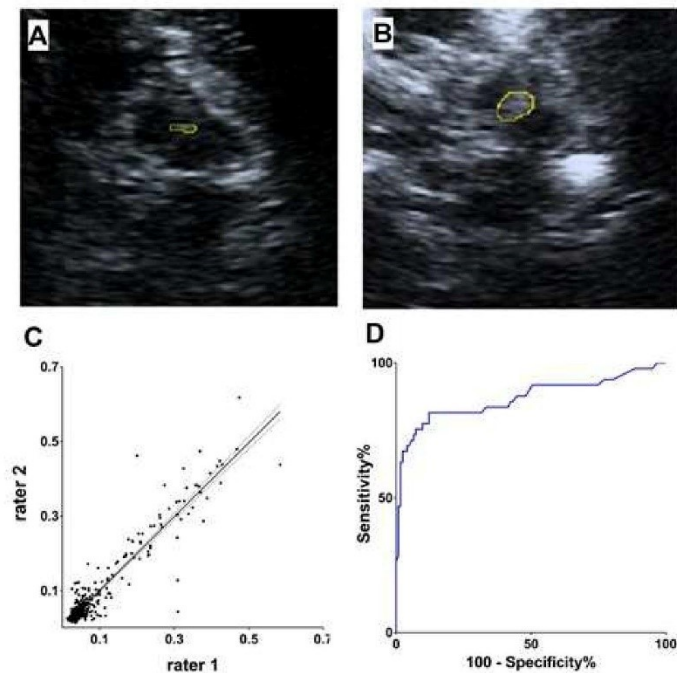


Figure 1 (double column fitting image) – TCS evaluation, hyperechogenic SN in hypoechogenic butterfly-like shape mesencephalon: Illustrative image of A) normal TCS (typical for healthy controls) and B) increased SN echogenicity (typical for PD); C) dot graph comparing SN area (cm^2) evaluations from both raters; D) specificity and sensitivity in distinguishing PD and control group using the cut off value 0.126 cm^2

TCS examination was performed by a single experienced sonographer (JM), who was blinded to the clinical symptoms and patient history. The acquired mesencephalic sonographic images were converted to DICOM format and evaluated using ImageJ (NIH, MD, USA) by two independent raters (JM, PS) blinded to the diagnosis. The hyperechogenicity area was encircled manually in both sides.

The intraclass correlation coefficient between raters confirmed high reliability of the assessment ($r^2=0.87$; $p < 0.001$; Fig.1C). The larger SN area from both sides was used for further analysis. As optimal cut off values may vary significantly between different sonographic devices and settings, we performed ROC analysis of SN area in a healthy cohort and PD group⁵². Using the optimal cut off value 0.126 cm² TCS reached 75.5% sensitivity and 92.7% specificity ($p < 0.0001$) in distinguishing PD and control groups (Fig.1D).

The proportion of insufficiently permeable temporal bone windows on both sides in originally examined subjects was 24% in iRBD (n=19), 25% in PD (n=15), which is slightly higher compared to the usual published 5-20% range^{7, 14, 38, 41, 53}, but only 3,3% in healthy controls (n=23); these subjects are not included in the tables or analyses.

2.3. DAT SPECT

DAT-SPECT analysis was largely analogous to that used in a previous RBD study⁵⁴. The examination was performed using the [123I]-2-b-carbomethoxy-3b-(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl) nortropane ([123I]FP-CIT, DaTscan®, GE Healthcare) tracer; approximately 185 MBq [123I]FP-CIT was injected intravenously. Scans were acquired 3 hours after tracer injection on a dual-head camera system (Infinia, GE Healthcare). The acquisition parameters were as follows: rotational radius 13-15 cm, image matrix 128×128, angular sampling with 120 projections at 3° interval and 40 seconds per view, zoom 1.3, energy window 159±10 % keV. Reconstruction of the raw SPECT projection data was performed using the ordered subset expectation maximization (OSEM) algorithm with 8 iterations and 10 subsets including Chang attenuation correction ($\mu = 0.11 \text{ cm}^{-1}$) and 3D Butterworth post-filtering with FWHM = 8 mm. Automated semi-quantitative analysis was performed using the BasGan V2 software (<https://www.aimn.it/site/page/gds/gds-5>) and specific binding ratios (SBR) in the caudate nucleus and putamen in each hemisphere were calculated relative to a occipital reference region. Consequently, linear regression of age and caudate/ putamen SBR values in 97 healthy subjects included in the BasGan V2 software and 32 internal controls previously examined in the General University Hospital in Prague was calculated and 95%, one-sided prediction intervals was constructed. According to the putaminal SBR from the hemisphere with lower tracer binding, DAT-SPECT scans with SBR < 95% prediction interval were classified as abnormal.

2.4. STATISTICS

Distributions of values of continuous variables were tested using the D'Agostino & Pearson normality test. Groupwise comparisons were done using either Student t-test, Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis, one-way ANOVA or univariate general linear model with age and sex as covariates; post-hoc tests were corrected for multiple comparisons using the method of honestly significant difference test (HSD) as appropriate. Contingency analyses were performed using Pearson Chi-square or Fischer's exact test. Pearson correlation coefficient or partial correlation coefficient controlling for age and sex

were used for testing of associations between variables. Statistica software version 12 (StatSoft) and Graphpad Prism version 6.07 (Graphpad software, San Diego, CA, USA) were used for statistical analysis.

3. RESULTS

3.1. Clinical assessment

Demographical data are shown in Tab.1. The iRBD group was slightly older ($p < 0.001$) and with higher male/female ratio ($p < 0.003$) compared to the PD and control group. The mean MDS-UPDRS III subscore in PD group was significantly higher compared to the iRBD group ($p < 0.0001$).

Table 1 – Demographic data

	PD group	iRBD group	Control group	p-value
Number of patients (females); n	44 (13)	61 (4)	120 (44)	-
Age; mean \pm SD (years)	56.3 \pm 12.4	66.4 \pm 8.1	55.5 \pm 12.2	< 0.001*
Duration of subjective symptoms; mean \pm SD (years) □	2.3 \pm 1.6	8.1 \pm 9.0	N.A.	-
Interval between RBD diagnosis and TCS; mean \pm SD (years)	-	0.69 \pm 0.99	-	-
SN area; median \pm IQR; mean \pm SD^x (cm²)	0.27 \pm 0.22; (0.23 \pm 0.13)	0.07 \pm 0.07; (0.11 \pm 0.11)	0.05 \pm 0.03; (0.06 \pm 0.05)	< 0.003**
MDS-UPDRS-III subscore; mean \pm SD	28.5 \pm 13	6.4 \pm 6.0	N.D.	< 0.0001
* One-way ANOVA, HSD post-hoc significant for iRBD vs controls and PD vs iRBD				
** One-way ANOVA, HSD post-hoc test significant for PD vs. controls ($p < 0.0001$); PD vs. iRBD ($p < 0.0001$); and iRBD vs. controls ($p < 0.003$)				
^x For comparison with previous studies, mean values are reported in brackets				
□ Duration of motor symptoms in PD and dream-enactment behavior in iRBD				

PD – Parkinson's disease; *iRBD* – idiopathic REM behavior disorder; *SD* – standard deviation; *SN* – substantia nigra; *IQR* – interquartile range; *MDS-UPDRS-III* – Movement Disorder Society, Unified Parkinson's Disease Rating Scale, motor examination

3.2. TCS findings

The abnormal SN area ($>0.126 \text{ cm}^2$) was found in 75.5% PD, 23% iRBD and 7.3% controls; contingency analysis confirmed significantly higher proportion of abnormal SN area in iRBD patients compared to controls (OR 4.22 [95% confidence interval 1.75 – 10.22], $p = 0.0007$).

Quantitative analysis showed that SN area in PD was higher compared to iRBD ($p < 0.0001$) and controls ($p < 0.0001$); SN area was also higher in iRBD compared to controls ($p < 0.003$, Tab.1). Sensitivity analysis comparing only iRBD patients and subgroup of age-matched controls confirmed significantly higher SN area in the iRBD group compared to controls ($p < 0.0001$).

In order to examine whether the presence of RBD influences the SN area in the PD group, patients with and without RBD were compared. RBD was present in 11 (25%) PD patients (PD+RBD) and their SN echogenicity area was not significantly different compared to PD-noRBD ($p = 0.15$, Tab.2).

Table 2 – SN echogenic area and DAT-SPECT specific binding ratios in iRBD and PD subgroups

	iRBD	PD without RBD (PD-noRBD)	PD with RBD (PD+RBD)	p-value
Number of patients (females)	61 (4)	33 (12)	11 (1)	$<0.0005^*$
SN area (cm^2), median \pm IQR (higher from both hemisphere)	0.07 ± 0.08	0.30 ± 0.14	0.22 ± 0.02	$<0.001^{**}$
Putaminal SBR (worse hemisphere)	2.9 ± 0.7	1.6 ± 0.3	1.2 ± 0.3	$<0.0001^{***}$
Caudate SBR (worse hemisphere)	3.8 ± 0.8	3.3 ± 0.6	2.6 ± 0.7	$<0.0004^{****}$
<p>* Two-sided Fisher's test for male/female ratio significant for iRBD vs PD-noRBD</p> <p>** One-way ANOVA, HSD post-hoc test significant for iRBD vs PD-noRBD ($p < 0.002$); and RBD vs. PD+RBD ($p < 0.001$)</p> <p>*** One-way ANOVA, HSD post-hoc test significant for iRBD vs PD-noRBD ($p < 0.0001$); and RBD vs PD+RBD ($p < 0.0001$)</p> <p>**** One-way ANOVA, HSD post-hoc test significant for iRBD vs PD+RBD; RBD vs PD-noRBD; PD+RBD vs PD-noRBD ($p < 0.0004$)</p>				

PD – Parkinson's disease; RBD – REM behavior disorder; SN – substantia nigra; IQR – interquartile range; SBR – striatal binding ratio

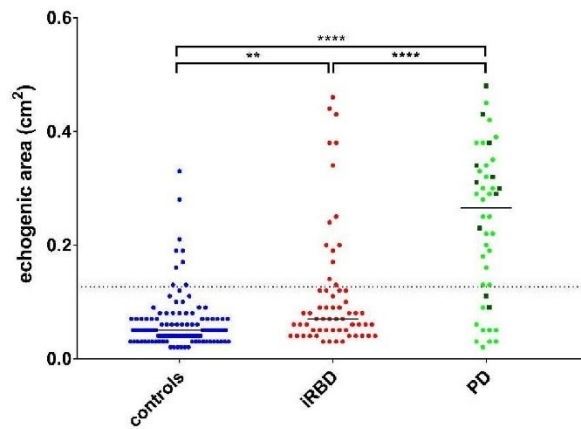


Figure 2 (single column fitting image) – Dot graphs comparing SN echogenic area in study groups (blue: controls, red: RBD, dark green rectangles: PD+RBD, light green circles: PD-noRBD)

3.3. DAT-SPECT findings

Abnormally decreased putaminal SBR was found in 16 (25.4%) iRBD and 44 (100%) PD patients. Corrected for age and sex, putaminal SBR from the worse hemisphere was significantly higher in the iRBD group, compared to the PD-noRBD group, and PD+RBD group (<0.0001). Caudate SBR from the worse hemisphere was also higher in iRBD compared to both PD-noRBD ($p<0.0004$) and PD+RBD ($p<0.0004$) subgroups; additionally, caudate SBR was lower in PD+RBD compared to PD-noRBD group ($p<0.0004$), see Tab.2).

3.4. Correlation between TCS, DAT-SPECT and clinical parameters

First, the larger SN area from bilateral TCS examination was used for the analysis and was compared with ipsilateral (corresponding) putaminal SBR. Contingency analysis comparing the concordance between DAT-SPECT and TCS findings showed that proportion of abnormal DAT-SPECT was not significantly different in iRBD patients with abnormal (35.7%) compared to normal (21.2%) TCS finding ($p=0.28$).

Quantitative comparison of patients with normal and abnormal TCS findings confirmed there were no differences in putaminal SBR, corrected for age and sex, corresponding to the SN with larger hyperechogenic area in both, iRBD ($p=0.45$) and PD group ($p=0.80$). Analysis of caudate SBR returned similar results ($p=0.63$ in iRBD and $p=0.84$ in PD group) (Tab.3). Partial correlation analysis corrected for age and sex showed no association between the larger SN area and putaminal SBR from the corresponding hemisphere in iRBD ($r=-0.13$, $p=0.29$), nor in PD group ($r=-0.19$, $p=0.22$), see Fig.3.

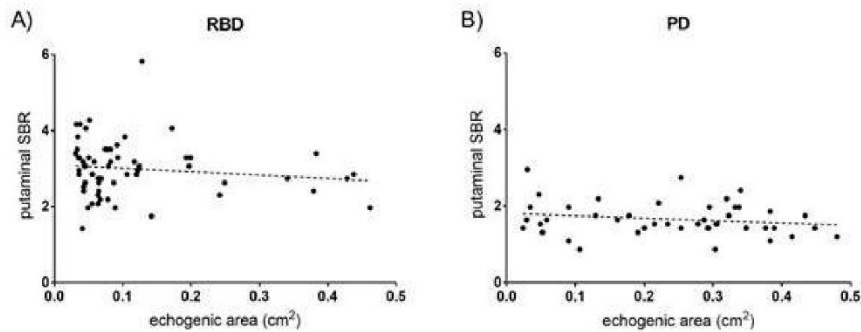


Figure 3 (double column fitting image) – Scatter graphs of correlation between putaminal SBR and SN area in A) iRBD and B) PD group.

Additionally, we did not find a difference in gender ($p=0.71$), nor in the mean age of symptoms onset between PD patients with normal (54.1 ± 15.2 years) and abnormal (54.2 ± 12.0 years) TCS findings. We also did not find correlation between the SN echogenicity area and age in neither group ($r=0.17$, $p=0.18$ in iRBD; $r=0.11$, $p=0.49$ in PD; $r=0.10$, $p=0.28$ in controls; Fig. 4).

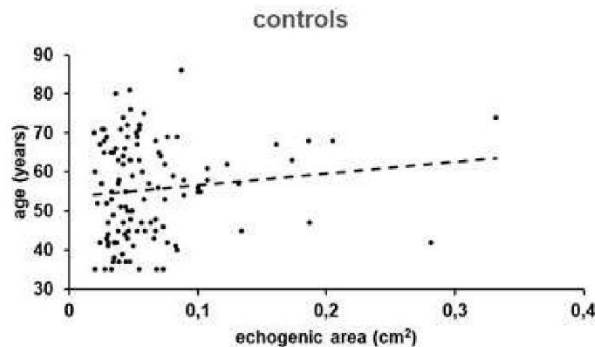


Figure 4 (single column fitting image) – Distribution of SN area according to age in healthy controls

Next, the influence of TCS and DAT-SPECT findings on motor function was examined; iRBD patients with normal findings on both (TCS and DAT-SPECT) examination methods had significantly lower MDS-UPDRS III score (4.9 ± 3.9) compared to patients with abnormality in at least one examination method (8.8 ± 6.9 ; $p=0.03$), see Tab.4. Additionally, partial correlation analysis corrected

for age and sex showed that MDS-UPDRS-III score was associated with SN echogenicity area in iRBD group ($r=0.27$, $p=0.045$) and with putaminal SBR in PD group ($r=-0.37$, $p=0.005$).

Table 4 – Proportion of iRBD subjects with normal and abnormal TCS and DAT-SPECT findings

		Abnormal SN area	Normal SN area
Abnormal putaminal SBR	Number of subjects; n	5	10
	MDS-UPDRS III subscore; mean \pm SD	6.4 \pm 3.6	9.0 \pm 9.0
Normal putaminal SBR	Number of subjects; n	9	37
	MDS-UPDRS III subscore; mean \pm SD	9.9 \pm 5.8	4.9 \pm 3.9

SN – substantia nigra; *SBR* – striatal binding ratio; *SD* – standard deviation; *MDS-UPDRS-III* – Movement Disorder Society, Unified Parkinson's Disease Rating Scale, motor examination

4. DISCUSSION

The results confirmed that: 1) the median SN echogenicity area in iRBD patients is slightly higher than that of controls, but values exceeding the cut off were present only in a minority of iRBD patients and 2) TCS SN area and DAT-SPECT binding indexes are not correlated in either, iRBD or PD group. In addition, we found that: 3) SN area does not differ between PD+iRBD and PD-noRBD and 4) motor function assessed by MDS-UPDRS III score was best preserved in iRBD patients with normal TCS and DAT-SPECT results.

The median values of SN area differed between the studied groups (PD>iRBD>healthy subjects), whereas the overall proportion of abnormal TCS finding was significantly higher in iRBD compared to healthy controls. The structural causes of the SN echogenicity changes are not well understood and may theoretically involve the role of iron deposits, glial activation or vascular changes⁵⁵⁻⁵⁹. The cut off value for SN area calculated for our data (0.126 cm²) is smaller than the usually mentioned value 0.20 cm² (Tab.5). The higher cut off values in previously published studies could be influenced by several factors: a) using different image processing of ultrasound device providers and previously published cut offs instead of calculating own specific values (see Tab.5 listing cut offs used in previous studies), b) adjusting the gain parameters, which can lead to the overestimation of the SN area and c) different strategies of SN area encircling.

Importantly, our cut off is based on analysis of results from two independent raters with a high between-rater agreement and its sensitivity and specificity are comparable to previous studies^{30, 53, 57, 59} (Fig.1 C,D). Unlike the previous publications, we used the median instead of the mean for SN area evaluation, because the distribution of values of SN area in healthy controls and iRBD subjects was abnormal.

Table 5 – Previously published TCS cut-off values in iRBD studies

First author + (publication year)	Cut off value (cm ²)	iRBD SN area (cm ²)	PD SN area (cm ²)	Control group SN area (cm ²)	Number of iRBD patients (abnormal TCS in %)	Ultrasound device
Iwanami et al (2010) ²⁶	0,20 (take over cut off)	0.20 ± 0.13	0.22 ± 0.11	0.06 ± 0.06	34 (41.2)	Logic 7, GE
Stockner et al (2009) ⁷	0,20 (90th percentile)	0.20 ± 0.09	N.A.	0.14 ± 0.05	51 (37.3)	Logic 7, GE
Iranzo et al (2010) ³⁸	0,20 (90th percentile)	0.20 ± 0.09	N.A.	0.14 ± 0.05	39 (36.0)	Logic 7, GE
Shin et al (2012) ³⁹	0,20 (take over cut off)	0.29 ± 0.47	0.72 ± 0.41	0.11 ± 0.17	12 (50.0)	Philips
Vilas et al (2015) ⁴⁰	0,20 (take over cut off)	0.24 ± 0.10	N.A.	0.176 ± 0.11	59 (62.7)	Phillips
Miyamoto et al (2013) ³⁶	0,18 (take over cut off)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Iranzo et al (2014) ⁴¹	0,20 (take over cut off)	0.20 ± 0.09	N.A.	N.A.	31 (32.3)	Logic 7, GE
Noyce et al. (2018) ⁴²	0,16 (take over cut off)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	GE Healthcare

REM – rapid eye movement; SN – substantia nigra; iRBD - idiopathic REM behavior disorder

Moreover, all sonographic images were acquired using the same TCS settings. These factors likely contributed to lower SN area and higher number of excluded patients due to the poor temporal bone window quality.

Abnormal TCS findings were present only in 23% iRBD patients. Previously published studies referred a higher proportion of iRBD patients with abnormal SN echogenicity area (from 32.3% to 62.7%)^{7, 26, 36, 38, 39, 41, 60}. The highest SN area was reported in study with a relatively low number of subjects (n=12) and short duration of symptoms (5.3 years)³⁹, which might lead to biased estimate. Aggregate results in all patients from the studies listed in Tab. 5 yields abnormal TCS findings in 44.2% iRBD subjects which is almost double the prevalence of pathological findings in this study. The main reason for the low percentage of TCS abnormalities is likely to be the use of other methodologies of SN area assessment. Especially we have used cut off value defined as optimal value for discrimination of PD and controls based on ROC analysis. Lowering the cut off value to 0.1 cm², which is the 90th percentile of SN area in the control cohort, yields abnormal TCS finding in 32.4% RBD patients. Thus, using commonly employed method for cut off value determination makes the

estimate of abnormal TCS finding prevalence in our RBD cohort more comparable to previous findings. We also cannot exclude the influence of other factors such as device settings or different composition of our RBD cohort).

The results confirmed that SN echogenicity is not associated with reduced striatal DAT uptake in any of examined groups. Moreover, in some subjects, the hemisphere with abnormal DAT-SPECT and enlarged SN area differed, which further confirms that these neuroimaging abnormalities are unrelated. Our conclusion corresponds to results of previously published studies^{18, 38, 48}.

To our best knowledge, this is the first study comparing TCS findings in PD patients with and without RBD. Most of the previously published studies comparing PD with and without RBD focused mainly on the difference of clinical^{44, 61} and DAT-SPECT findings. In our study, patients with prodromal (iRBD) and manifest (PD+RBD) synucleinopathy presenting with RBD differed in both, DAT-SPECT and TCS, results with significantly worse findings in PD+RBD. According to a prospective study by Iranzo et al, presence of RBD may mark a distinctive synucleinopathy phenotype with different mechanisms of neurodegeneration¹⁰. Abnormal SN hyperechogenic area is present not only in PD with and without RBD, but also in DLB, a disorder with high frequency of RBD and bilateral TCS abnormalities^{5, 62}.

Idiopathic RBD patients with normal TCS and normal DAT-SPECT have significantly lower motor deficit in the study suggesting that pathology in either type of examination has some functional consequence. It has been shown that pathology in both methods, TCS and DAT-SPECT, is a risk factor for early phenoconversion^{38, 41}. However, the importance of normal SN echogenicity alone for RBD phenoconversion has also not yet been properly assessed. Based on our observations, we assume that normal SN area in synucleinopathies is not associated with RBD in general but appears to be common in patients with RBD preceding the development of parkinsonism with a longer time delay. Although a smaller SN area in PD was previously found to be associated with later onset of symptoms⁶³, we did not confirm this result. We speculate that hyperechogenic SN is more vulnerable to alpha-synuclein pathology and TCS abnormality could thus represent a risk factor for the appearance of motor symptoms with less severe degeneration of dopaminergic neurons. On the contrary, dopaminergic neurons in subjects with normal SN echogenic area may be less sensitive to the effect of alpha-synuclein pathology, which may first present by symptoms of damage of other nuclei before parkinsonism manifests. These theories will have to be verified by long-term observation of larger number of RBD subjects.

Association between abnormal TCS finding and worse MDS-UPDRS III score previously found in elderly population⁶⁴ was only partially confirmed in iRBD patients in our study. Besides mild correlation between MDS-UPDRS III and SN area, the difference in motor function between iRBD patients with normal and abnormal TCS finding became significant only when putaminal DAT-

SPECT binding was taken into account. This finding is consistent with the assumption that SN hyperechogenicity alone does not significantly affect the severity of motor deficit, but with simultaneous neurodegenerative process becomes a fragile terrain for early nigrostriatal dysfunction.

The limitations of the study were the cross-sectional design, absence of DAT-SPECT examination and MDS-UPDRS III score in healthy subjects, and relatively small number of PD patients with RBD. Further limitation were slightly higher age and the predominance of males in the iRBD group. Importantly, several studies have shown no correlation between gender, age and SN echogenic area⁴¹⁻⁴³ indicating that slight age and gender imbalance have not significantly biased our results.

The results of our study confirmed different SN echogenicity changes in PD, iRBD and control group. According to the findings, iRBD patients have a relatively low prevalence of abnormal TCS findings, while the SN echogenicity pattern in PD with RBD is comparable to PD without RBD. Thus, patients with long-term iRBD preceding phenoconversion likely represent a specific phenotype of synucleinopathy. Normal TCS and DAT-SPECT findings are associated with normal motor function in iRBD patients. Finally, we conclude that the SN hyperechogenicity reflects structural and DAT-SPECT functional changes in dopaminergic pathway. TCS and DAT-SPECT examinations are complementary but not substitutable.

Acknowledgements

This study was supported by Czech Science Foundation, grant nr. GACR 16-07879S

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Postuma RB, Gagnon JF, Montplaisir JY. REM Sleep Behavior Disorder and Prodromal Neurodegeneration - Where Are We Headed? *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* 2013;3.
2. Postuma RB. Prodromal Parkinson's disease--using REM sleep behavior disorder as a window. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20 Suppl 1:S1-4.
3. Hogl B, Stefani A, Videnovic A. Idiopathic REM sleep behaviour disorder and neurodegeneration - an update. *Nature reviews Neurology* 2018;14:40-55.
4. Walter U, Dressler D, Wolters A, Wittstock M, Greim B, Benecke R. Sonographic discrimination of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia. *J Neurol* 2006;253:448-454.
5. Favaretto S, Walter U, Baracchini C, et al. Accuracy of transcranial brain parenchyma sonography in the diagnosis of dementia with Lewy bodies. *Eur J Neurol* 2016;23:1322-1328.
6. Iranzo A, Molinuevo JL, Santamaria J, et al. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. *Lancet Neurol* 2006;5:572-577.
7. Stockner H, Iranzo A, Seppi K, et al. Midbrain hyperechogenicity in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Mov Disord* 2009;24:1906-1909.
8. Postuma RB, Montplaisir J. Transcranial ultrasound and olfaction in REM sleep behavior disorder: testing predictors of Parkinson's disease. *Sleep Med* 2010;11:339-340.
9. Galbiati A, Verga L, Giora E, Zucconi M, Ferini-Strambi L. The risk of neurodegeneration in REM sleep behavior disorder: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Sleep Med Rev* 2018;43:37-46.
10. Iranzo A, Fernandez-Arcos A, Tolosa E, et al. Neurodegenerative disorder risk in idiopathic REM sleep behavior disorder: study in 174 patients. *PLoS One* 2014;9:e89741.
11. Postuma RB. Prodromal Parkinson disease: do we miss the signs? *Nat Rev Neurol* 2019;15:437-438.
12. Postuma RB, Iranzo A, Hu M, et al. Risk and predictors of dementia and parkinsonism in idiopathic REM sleep behaviour disorder: a multicentre study. *Brain* 2019;142:744-759.
13. Jennings D, Siderowf A, Stern M, et al. Conversion to Parkinson Disease in the PARS Hypoosmic and Dopamine Transporter-Deficit Prodromal Cohort. *JAMA Neurol* 2017;74:933-940.
14. Shih MC, Hoexter MQ, Andrade LA, Bressan RA. Parkinson's disease and dopamine transporter neuroimaging: a critical review. *Sao Paulo Med J* 2006;124:168-175.
15. van Dyck CH, Seibyl JP, Malison RT, et al. Age-related decline in striatal dopamine transporter binding with iodine-123-beta-CITSPECT. *J Nucl Med* 1995;36:1175-1181.
16. Isaias IU, Trujillo P, Summers P, et al. Neuromelanin Imaging and Dopaminergic Loss in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 2016;8:196.
17. Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991;114 (Pt 5):2283-2301.
18. Spiegel J, Hellwig D, Mollers MO, et al. Transcranial sonography and [123I]FP-CIT SPECT disclose complementary aspects of Parkinson's disease. *Brain* 2006;129:1188-1193.
19. Walter U, Behnke S, Eyding J, et al. Transcranial brain parenchyma sonography in movement disorders: state of the art. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:15-25.
20. Berg D, Godau J, Walter U. Transcranial sonography in movement disorders. *Lancet Neurol* 2008;7:1044-1055.
21. Bouwmans AE, Vlaar AM, Srujijes K, Mess WH, Weber WE. Transcranial sonography for the discrimination of idiopathic Parkinson's disease from the atypical parkinsonian syndromes. *Int Rev Neurobiol* 2010;90:121-146.
22. Busse K, Heilmann R, Kleinschmidt S, et al. Value of combined midbrain sonography, olfactory and motor function assessment in the differential diagnosis of early Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:441-447.
23. Kim JS, Oh YS, Kim YI, Koo JS, Yang DW, Lee KS. Transcranial sonography (TCS) in Parkinson's disease (PD) and essential tremor (ET) in relation with putative premotor symptoms of PD. *Arch Gerontol Geriatr* 2012;54:e436-439.
24. Pilotto A, Yilmaz R, Berg D. Developments in the role of transcranial sonography for the differential diagnosis of parkinsonism. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2015;15:43.
25. Alonso-Canovas A, Lopez-Sendon JL, Buisan J, et al. Sonography for diagnosis of Parkinson disease--from theory to practice: a study on 300 participants. *J Ultrasound Med* 2014;33:2069-2074.

26. Iwanami M, Miyamoto T, Miyamoto M, Hirata K, Takada E. Relevance of substantia nigra hyperechogenicity and reduced odor identification in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Sleep medicine* 2010;11:361-365.
27. Bartova P, Skoloudik D, Ressler P, Langova K, Herzig R, Kanovsky P. Correlation between substantia nigra features detected by sonography and Parkinson disease symptoms. *J Ultrasound Med* 2010;29:37-42.
28. Ambrosius W, Michalak S, Owecki M, Lukasik M, Florczak-Wypianska J, Kozubski W. Substantia nigra hyperechogenicity in Polish patients with Parkinson's disease. *Folia Morphol (Warsz)* 2014;73:267-271.
29. Walter U, Dressler D, Wolters A, Wittstock M, Benecke R. Transcranial brain sonography findings in clinical subgroups of idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007;22:48-54.
30. Ressler P, Skoloudik D, Hlustik P, Kanovsky P. Hyperechogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neuroimaging* 2007;17:164-167.
31. Berg D, Siefker C, Ruprecht-Dorfler P, Becker G. Relationship of substantia nigra echogenicity and motor function in elderly subjects. *Neurology* 2001;56:13-17.
32. Mehnert S, Reuter I, Schepp K, Maaser P, Stolz E, Kaps M. Transcranial sonography for diagnosis of Parkinson's disease. *BMC Neurol* 2010;10:9.
33. Walter U, Niehaus L, Probst T, Benecke R, Meyer BU, Dressler D. Brain parenchyma sonography discriminates Parkinson's disease and atypical parkinsonian syndromes. *Neurology* 2003;60:74-77.
34. Toomsoo T, Liepelt-Scarfone I, Berg D, et al. Effect of Age on Substantia Nigra Hyper-echogenicity in Parkinson's Disease Patients and Healthy Controls. *Ultrasound Med Biol* 2019;45:122-128.
35. Hagenah J, Konig IR, Sperner J, et al. Life-long increase of substantia nigra hyperechogenicity in transcranial sonography. *Neuroimage* 2010;51:28-32.
36. Miyamoto M, Miyamoto T. Neuroimaging of rapid eye movement sleep behavior disorder: transcranial ultrasound, single-photon emission computed tomography, and positron emission tomography scan data. *Sleep Med* 2013;14:739-743.
37. Iranzo A, Santamaria J, Valldeoriola F, et al. Dopamine transporter imaging deficit predicts early transition to synucleinopathy in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Ann Neurol* 2017;82:419-428.
38. Iranzo A, Lomena F, Stockner H, et al. Decreased striatal dopamine transporter uptake and substantia nigra hyperechogenicity as risk markers of synucleinopathy in patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a prospective study [corrected]. *Lancet Neurol* 2010;9:1070-1077.
39. Shin HY, Joo EY, Kim ST, Dhong HJ, Cho JW. Comparison study of olfactory function and substantia nigra hyperechogenicity in idiopathic REM sleep behavior disorder, Parkinson's disease and normal control. *Neurol Sci* 2013;34:935-940.
40. Vilas D, Iranzo A, Pont-Sunyer C, et al. Brainstem raphe and substantia nigra echogenicity in idiopathic REM sleep behavior disorder with comorbid depression. *J Neurol* 2015;262:1665-1672.
41. Iranzo A, Stockner H, Serradell M, et al. Five-year follow-up of substantia nigra echogenicity in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Mov Disord* 2014;29:1774-1780.
42. Noyce AJ, Dickson J, Rees RN, et al. Dopamine reuptake transporter-single-photon emission computed tomography and transcranial sonography as imaging markers of prediagnostic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2018;33:478-482.
43. Romenets SR, Gagnon JF, Latreille V, et al. Rapid eye movement sleep behavior disorder and subtypes of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012;27:996-1003.
44. Liu Y, Zhu XY, Zhang XJ, Kuo SH, Ondo WG, Wu YC. Clinical features of Parkinson's disease with and without rapid eye movement sleep behavior disorder. *Transl Neurodegener* 2017;6:35.
45. Bauckneht M, Chincarini A, De Carli F, et al. Presynaptic dopaminergic neuroimaging in REM sleep behavior disorder: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev* 2018;41:266-274.
46. Berg D. Transcranial sonography in the early and differential diagnosis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 2006:249-254.
47. Dusek P, Roos PM, Litwin T, Schneider SA, Flaten TP, Aaseth J. The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements* 2015;31:193-203.
48. Doepp F, Plotkin M, Siegel L, et al. Brain parenchyma sonography and 123I-FP-CIT SPECT in Parkinson's disease and essential tremor. *Mov Disord* 2008;23:405-410.
49. Postuma RB, Berg D, Stern M, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2015;30:1591-1601.
50. Postuma RB, Poewe W, Litvan I, et al. Validation of the MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2018;33:1601-1608.

51. Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, et al. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord* 2008;23:2129-2170.
52. Li DH, He YC, Liu J, Chen SD. Diagnostic Accuracy of Transcranial Sonography of the Substantia Nigra in Parkinson's disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep* 2016;6:20863.
53. Fernandes Rde C, Rosso AL, Vincent MB, et al. Transcranial sonography as a diagnostic tool for Parkinson's disease: a pilot study in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2011;69:892-895.
54. Dušek P, Ibarburu VLyL, Bezdicek O, et al. Relations of non-motor symptoms and dopamine transporter binding in REM sleep behavior disorder. *Scientific Reports* 2019;9:15463.
55. Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, et al. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005;57:168-175.
56. Berg D, Merz B, Reiners K, Naumann M, Becker G. Five-year follow-up study of hyperechogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005;20:383-385.
57. Berg D, Grote C, Rausch WD, et al. Iron accumulation in the substantia nigra in rats visualized by ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1999;25:901-904.
58. Berg D, Godau J, Riederer P, Gerlach M, Arzberger T. Microglia activation is related to substantia nigra echogenicity. *J Neural Transm (Vienna)* 2010;117:1287-1292.
59. Berg D, Roggendorf W, Schroder U, et al. Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury. *Arch Neurol* 2002;59:999-1005.
60. Unger MM, Moller JC, Stiasny-Kolster K, et al. Assessment of idiopathic rapid-eye-movement sleep behavior disorder by transcranial sonography, olfactory function test, and FP-CIT-SPECT. *Mov Disord* 2008;23:596-599.
61. Yan YY, Lei K, Li YY, Liu XF, Chang Y. The correlation between possible RBD and cognitive function in Parkinson's disease patients in China. *Ann Clin Transl Neurol* 2019;6:848-853.
62. Walter U, Dressler D, Wolters A, Probst T, Grossmann A, Benecke R. Sonographic discrimination of corticobasal degeneration vs progressive supranuclear palsy. *Neurology* 2004;63:504-509.
63. Berg D, Siefker C, Becker G. Echogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease and its relation to clinical findings. *J Neurol* 2001;248:684-689.
64. Berg D, Seppi K, Liepelt I, et al. Enlarged hyperechogenic substantia nigra is related to motor performance and olfaction in the elderly. *Mov Disord* 2010;25:1464-1469.