

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

**Role akumulace železa a dalších kovů
v patofyziologii neurodegenerativních onemocnění**

MUDr. Jana Mašková

2020

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Neurovědy

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jan Laczó

Školící pracoviště: Neurologická klinika a Centrum klinických neurověd,
1.lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Všeobecná fakultní nemocnice

Školitel: MUDr. Petr Dušek, Ph.D.

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

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt:.....	4
Summary:	5
1. Úvod.....	6
2. Hypotézy a cíle práce	8
3. Metodika.....	9
4. Výsledky a diskuse.....	10
6. Závěry	18
7. Použitá literatura	19
8. Seznam publikací	20

Abstrakt:

Vliv kumulace kovů na patofyziologii neurodegenerativních onemocnění je dlouhodobě diskutovaným tématem zejména kvůli snaze o jeho ovlivnění chelatační terapií. Mechanismy zániku buněk jsou dobře prozkoumané, ale role kovů v nich je stále předmětem diskusí. Hlavním úskalím je jejich omezená zobrazitelnost běžně dostupnými klinickými metodami.

Cílem práce bylo posouzení možností využití transkraniální sonografie (TCS), která je již zavedenou metodou v diagnostice Parkinsonovy nemoci (PN), i u jiných neurologických onemocnění v manifestní i presymptomatické fázi. Využitím ultrazvukového fúzního zobrazování s magnetickou rezonancí (MR) jsme ověřili lokalizaci mozkových struktur a zaměřili jsme se na detekci přítomnosti ložiskových strukturálních změn potenciálně ovlivňujících echogenitu.

Předmětem našeho zájmu byla onemocnění s prokázanou poruchou metabolismu kovů v jejich patogenezi – Parkinsonova nemoc a Wilsonova nemoc (WN) – a idiopatická porucha chování v REM spánku (iRBD). Ta představuje potvrzenou prodromální fázi synukleinopatií s vysokým rizikem fenokonverze.

Indexy echogenity substantia nigra (SN) a nucleus lentiformis (NL), stanovené digitální analýzou snímků z fúze TCS/MR, se potvrdily jako vysoce spolehlivé markery v diferenciální diagnostice WN a Parkinsonovy nemoci s časným počátkem (EO-PN) dosahující senzitivity 93,8 % a specifity 90,9 %. Díky fúzi jsme stanovili hyperechogenitu inzuly jako nový specifický nález u WN. U pacientů s iRBD jsme potvrdili přítomnost zvýšené echogenity SN, ale ve výrazně nižším procentu, než bylo dosud publikováno (23 % vs. 32-63 %). Naše výsledky naznačují, že echogenita SN u pacientů s PN není ovlivněna RBD příznaky.

Přímou vazbu depozit kovů na echogenitu zobrazovanou TCS se ani při využití fúze s MR nepodařilo prokázat. Změny na TCS pravděpodobně odráží až kovy indukované sekundární změny. Vzhledem k úzkým interakcím mezi železem, mědí a dalšími kovy není možné jejich role v neurodegeneraci posuzovat odděleně.

Na základě zjištěných výsledků by TCS mohla být využívána jako screeningové vyšetření nejen extrapyramidových pacientů s atypickým klinickým obrazem, ale i osob v potenciálním riziku rozvoje neurodegenerace. Ovlivnění presymptomatické fáze neurologických onemocnění je v současnosti předmětem intenzivního výzkumu.

Summary:

The influence of metal accumulation on the pathophysiology of neurodegenerative diseases has been a long-discussed topic, mainly due to the effort to influence it. The principles of cell death and neurodegeneration are well researched. However, the mechanism of metals involvement in these processes is still under discussion. The main reason for the ambiguity of the influence of metals is their limited visualization by commonly available clinical imaging methods.

Transcranial sonography (TCS) is already an established method in the diagnosis of Parkinson's disease (PD). The aim of the studies was to assess the possibilities of using TCS in other neurological diseases not only in the manifest, but also in presymptomatic phase. Firstly we verified the localization of brain structures by using the ultrasound fusion imaging with magnetic resonance imaging (MRI). Secondly we focused on detecting the presence of the structural changes, which could potentially affecting echogenicity.

The area of our interest were diseases with a proven disorder of metal metabolism in their pathogenesis like Parkinson's disease and Wilson's disease (WD). We were also interested in TCS/MR findings in idiopathic behavior disorder in REM sleep (iRBD), which represents a prodromal phase of synucleinopathies and it is connected with a high risk of phenoconversion.

The substantia nigra (SN) and nucleus lentiformis (NL) echogenicity indices determined by digital analysis of fusion images are highly reliable markers in the diagnosis of early onset PD and WD with sensitivity 93,8 % and specificity 90,9 %. Furthermore, we determined hyperechogenicity of insula as a new specific finding in WD. In patients with iRBD, we confirmed the presence of increased SN echogenicity, but the proportion of abnormal findings was significantly lower than it is usually stated (23 % vs. 32-63 %). The analysis of PD subgroups with and without RBD symptoms did not show different SN echogenicity.

The direct effect of metal deposits on TCS echogenicity was not proved, even when using fusion with MRI. TCS abnormalities probably reflect secondary induced changes. Due to the close interactions between iron, copper and other metals, it is not possible to assess their role in neurodegeneration separately.

TCS could be used as a screening method not only for extrapyramidal patients with an atypical clinical course, but also for persons at potential risk of developing neurodegeneration. The influencing of presymptomatic phases by régime (e.g. diet or physical activity) is currently the subject of intensive research.

1. Úvod

Neurodegenerativní onemocnění jsou hereditární nebo sporadické choroby spojené se zánikem specifických populací nervových buněk. Mezi hlavní procesy neurodegenerace patří konformační změny proteinů, oxidativní stres s formací reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), poruchy mitochondrií, poruchy energetického metabolismu a zánětlivé změny.[1]. Společným vyústěním je buněčná smrt (apoptóza, nekrózy nebo ferroptóza). Ferroptóza je specifickou programovanou smrtí buněk, závislou na hladinách železa.[2]

Klinický obraz neurodegenerace závisí více na populaci zaniklých buněk než na mechanismu, kterým k němu došlo. Řada onemocnění se navíc klinicky i molekulárně-biologicky překrývá (overlap syndrome).[3]

Vliv kumulace kovů na rozvoj neurodegenerace je nejvíce prozkoumán u železa. Jeho koncentrace v mozku se zvyšuje i v procesu fyziologického stárnutí s největší predilekcí ukládání v SN, putamen a globus pallidus.[4] Při patologických stavech se zvyšuje zastoupení reaktivních forem železa. Ty sekundárně poškozují mitochondrie produkcí kyslíkových radikálů a peroxidací lipidů.[5] Role mědi je zevrubně prozkoumána zejména u WN. Její kumulace predilekčně v NL byla potvrzena i neuropatologickými studiemi, ale zobrazení její distribuce v mozku není pomocí MR možné.[6] Kumulace zinku a manganu v mozku není obvyklá, ale jejich zvýšené či snížené hladiny mohou významně interferovat s metabolismem dalších kovů.

Hromadění jednoho kovu často vede k poruše absorpce jiných cestou mechanismem sdílení transportérů (např. nedostatek železa indukuje aktivaci nespecifických přenašečů zvýšené vstřebávání manganu, nikl nebo olova). Tyto interakce jsou využívány i terapeuticky (např. terapie zinkem u Wilsonovy nemoci).[7]

Mezi faktory ovlivňující kumulaci kovů ve vyšším věku patří poruchy jejich metabolismu a homeostázy, zvýšená propustnost hematoencefalické bariéry nebo opakované záněty. Chelatační léčba u některých neurodegenerací vedla ke snížení toxického působení železa, zinku a mědi na produkci alfa synukleinu.[8]

Hlavní limitací zobrazování jednotlivých kovů u neurodegenerací je nízká specificita konvenční MR, která detekuje kovy pouze nepřímo, díky jejich vlivu na relaxační časy. 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.

Alternativní metodou zobrazení je TCS. U PN je rozšířenou podpůrnou diagnostickou metodou dosahující vysoké specificity 83-87 % a senzitivity 93-100 %. U PN je typickým nálezem asymetrická hyperechogenita SN.[9] U WN je typicky

popisováno hyperechogenní NL.[10] Podklad vzniku echogenity u TCS je nejasný. Široce diskutován je přímý vliv depozit kovů, mikroskopické poškození mozkové tkáně nebo lokální zánětlivé změny.[11, 12]

Hlavní limitací širšího použití TCS v klinické praxi je nutnost vyšetření zkušeným sonografistou a subjektivita hodnocení nálezů. Tato omezení je možné snížit použitím fúzního zobrazení a automatické softwarové analýzy.[13]

TCS se uplatňuje nejen v diagnostice manifestních, ale i presymptomatických neurodegenerativních onemocnění. 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[14] jako jsou PN, demence s Lewyho tělísky (DLB) nebo multisystémová atrofie (MSA). Ke konverzi do neurodegenerace dochází při dlouhodobém sledování až u 90 % iRBD subjektů.[15]

DAT-SPECT (*dopamine transporter single-photon emission computed tomography*) je u pacientů s iRBD užitečným markerem časně konverze do manifestní synukleinopatie.[16] Jeho přínos v odhalování osob v riziku je výrazně zvyšován kombinací s dalšími vyšetřovacími metodami, zejména s TCS. Při abnormálním nálezu na obou zobrazovacích metodách se riziko konverze během následujícího 2,5 roku zvyšuje až na 100 %.[16]

U pacientů s iRBD je v porovnání s kontrolami častěji přítomna hyperechogenita SN. Avšak pacienti s iRBD ani po fenokonverzi nedosahují hodnot SN arey popisovaných u PN. Není tedy možné vyloučit, že mechanismus vzniku SN hyperechogenity se mezi těmito klinickými jednotkami liší. Ačkoliv nejspíše vzniká v totožném terénu fragilní oblasti.[15]

2. Hypotézy a cíle práce

- A) 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.*

- B) 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.*

- C) Porovnat echogenitu substantia nigra mezi kontrolami, idiopatickou poruchou chování v REM spánku (iRBD) a Parkinsonovou nemocí s a bez diagnostikované RBD. Dále zhodnotit asociaci mezi degenerací substantia nigra hodnocenou na DAT-SPECT a transkraniální sonografií.

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

3. Metodika

3.1 Pacienti

V rámci našich studií jsme vyšetřili 23 pacientů s WN, 23 pacientů s EO-PN, 44 de novo pacientů s PN, 61 pacientů s iRBD a 120 zdravých dobrovolníků.

3.2 Transkraniální sonografie

TCS vyšetření bylo provedeno ve všech studiích s totožným nastavením, ale s užitím dvou odlišných sonografických přístrojů (Esaote MyLab Twice vybavený funkcí virtuální navigace a Toshiba Aplio 300).

Echogenita bazálních ganglií (substantia nigra, nucleus lentiformis, nucleus caudatus, globus pallidus) a struktur mozkového kmene (nuclei raphe) byla měřena ve standardním thalamickém a mezencefalickém řezu.

Ve finální analýze byly hodnoceny pouze subjekty s bilaterálně přístupným temporálním oknem. Všechna vyšetření byla prováděna v totožném nastavení, bez dodatečných úprav parametrů. Korekce parametrů, post-processing a v okolí ležící struktury (nucleus ruber, cévní struktury) jsou nejčastějšími příčinami nadhodnocování SN arey i dalších struktur. Ve všech studiích byl stanoven cut off pro konkrétní sonografický systém, buď jako optimální hodnota pro odlišení PN od zdravých kontrol na základě ROC analýzy nebo jako 90. percentil SN arey v kohortě zdravých subjektů.

K finální analýze byla použita strana s vyšší echogenicitou na TCS, nezávisle na klinickém nálezů nebo výsledku DAT-SPECT. Hodnocení echogenie arey jednotlivých jader bylo kvantitativní. U snímků získaných ze studií na Esaote byl k analýze použit automatizovaný softwarový program B-mode Assist Systém. Výsledkem analýzy byly indexy echogenicity. TCS nálezy měřené na přístroji Toshiba byly převedeny do formátu DICOM (*Digital Imaging and Communications in Medicine*), dodatečně manuálně ohraničeny dvě nezávislými hodnotiteli v programu ImageJ a výsledkem byl obsah ohraničené oblasti v cm^2 . S ohledem na nepravidelné rozložení SN arey ve zdravé populaci byly výsledky prezentovány jako medián \pm směrodatná odchylka.

3.3 MR mozku

K vyloučení strukturální patologie byla u všech pacientů doplněna MR na 1.5T přístroji (Philips Achieva). Byly provedeny standardní T1 vážené sekvence (rozlišení $1.2 \times 1.2 \times 3 \text{mm}^3$, TE 15ms, TR 500ms) a T2 vážené sekvence (rozlišení $0.5 \times 0.5 \times 2 \text{mm}^3$, TE 233ms, TR 2250ms). Zkušeným neuroradiologem byl zhodnocen stupeň mozkové atrofie. Získané MR snímky byly následně použity pro následnou fúzi s TCS.

3.4 Fúze TCS/MR

Snímky MR mozku byly ve formátu DICOM nahrány do ultrazvukového přístroje, který je převedl do 3D formátu a vytvořil 3D model hlavy. Na čelo pacienta byl umístěn malý senzor k eliminaci vlivu pohybových artefaktů. K fúzi snímků se značkovačem zaměřily základní orientační body na obličej pacienta (čelo, nos a oční koutky) a snímač se připojil se na ultrazvukovou sondu. Na obrazovce bylo možné prohlížet jak izolované TCS snímky nebo MR snímky, tak jejich vzájemné překrytí v jednom obraze.

4. Výsledky a diskuse

4.1. Studie I – Porovnání fúze TCS s MR u WN a EO-PN

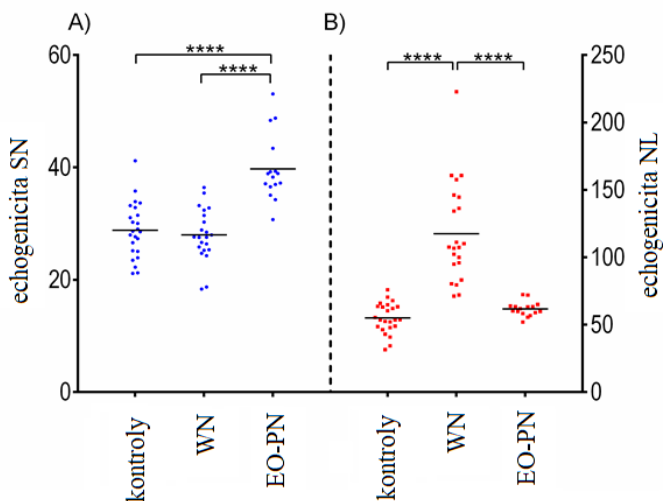
Výsledky

V porovnání se zdravými kontrolami byla u skupiny EO-PN přítomna zvýšená SN echogenita a u skupiny s WN zvýšená echogenita NL (viz Obr.1). Skupinová analýza byla významná pro obě zmíněné oblasti mozku: SN ($F [2, 59] = 30.0, p < 0,0001$) a NL ($F [2, 59] = 47.2, p < 0,0001$). 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 NL 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 NL byly pozorovány také u nucleus caudatus (NC).

Nikdo ze skupiny šesti pacientů s WN s normálním MR nálezem neměl normální echogenitu NL. U pacientů s WN, kteří vykazovali hypersignální změny v putamen, byl index echogenity NL 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 NL mezi pacienty s hyposignálním a normálním nálezem v NL 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 hyperintenzní signál v mezencefalické bílé hmotě. MR signál NL byl normální u 6 pacientů; T2 hyposignální u 12 pacientů; u 13 pacientů byl pak zjištěn vyšší T2 signál v putamen. Skóre závažnosti postižení MR mozku bylo u WN ve srovnání se skupinou EO-PN vyšší.

Diskuze

Indexy echogenity SN a NL, 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 parkinsonismu s atypickým průběhem.



Obr.1 - Index echogenity v A) substantia nigra (SN) a B) nucleus lentiformis (NL) u kontrolních subjektů, pacientů s Wilsonovou nemocí a s 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.

Hyperchogenita SN byla detekována v 93,8 % případů a index echogenity NL byl abnormální pouze u dvou EO-PN pacientů. Nálezy u pacientů s EO-PN byly v souladu s předchozími studii zaměřenými na TCS.

U pacientů s WN byl index echogenity NL abnormální v 95,5 %. 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 % prevalence hyperchogenity SN u WN.[17] Nález normální echogenity u pacientů s WN je překvapivý, uvážíme-li, že většina z nich byla postižena parkinsonismem. 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. Parkinsonismus u našich pacientů by tak mohl být způsoben převážně postsynaptickým poškozením.

U pacientů s WN jsme neprokázali korelaci mezi změnami echogenity, klinickou závažností a délkou trvání nemoci nebo léčby. TCS tedy pravděpodobně není možné

použit jako spolehlivý marker pro dlouhodobé sledování chelatační terapie nebo prognózy postižení.

Abnormální sonografický nálezn NL byl přítomný u všech pacientů s WN, včetně podskupiny s normálním nálezem na MR mozku. To naznačuje, že TCS zobrazuje jiný mechanismus tkáňových změn. Vliv hromadění železa s odpovídajícími T2 hypointenzitami na MR se v naší studii nepotvrdil. Prokázali jsme spojení hyperechogenity NL spíše s putaminální T2 hyperintenzitou než s T2 hypointenzitou.

Změny echogenity NL u WN by mohly být ovlivňovány i jinými kovy. Například mědi, což by bylo v souladu s provedenými neuropatologickými rozborů, nebo manganem, který se u jatrních poruch zvýšeně ukládá v mozku.

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 jediný aspektem abnormálních nálezů na TCS. Možný vliv dalších kovů na echogenitu bazálních ganglií nebylo možné v naší studii potvrdit ani 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.

V kontrolní skupině byl mírně zvýšený echogenní nálezn NL zjištěn u 3 subjektů. SN oblast byla hyperechogenní u 10 % zdravých kontrol 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 presymptomatické 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.

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.

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

Výsledky

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 NL 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 ($29,47 \pm 5,27$; $p < 0,001$).

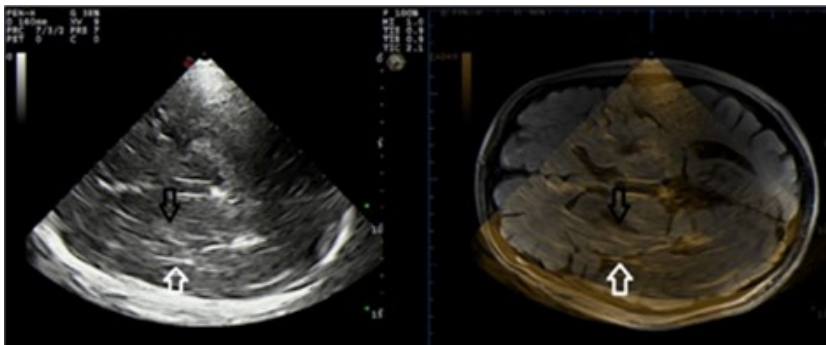
Šířka třetí komory byla větší u pacientů s WN ($7,84 \pm 2,70$ mm) ve srovnání s pacienty s EO-PN ($3,98 \pm 1,37$ mm; $p = 0,016$) a zdravými kontrolami ($2,94 \pm 0,54$ mm; $p = 0,002$). Mezi subjekty s EO-PN a WN nebyly v zastoupení atrofie zjištěny žádné významné rozdíly ($p = 0,667$, $p = 0,105$ a $p = 0,051$).

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 NL. Korelace s věkem, trváním onemocnění nebo závažností symptomů stanovených pomocí UWDRS se však nepotvrdila.

Diskuze

Pacienti s WN a EO-PN se liší nejen z hlediska echogenity SN a NL, ale i nálezem v insulární oblasti (viz Obr.2). Skupina s WN měla jako jediná abnormální sonografický nález v NL i inzule. Tyto výsledky ukazují, že echogenita inzuly může být použita jako další diagnostický marker pro rozlišení mezi WN a EO-PN. Mezi echogenitou obou struktur byla navíc pozorována silná pozitivní korelace, která naznačuje, že patologický proces v obou lokalizacích bude identický.

Kromě vlivu kovů a lokálních změn tkání na TCS je zvažován také podíl mozkové atrofie. U pacientů s WN byla difúzní kortikální a subkortikální atrofie popsána častěji než u EO-PN a 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.



Obr.2 – Fúze transkraniální sonografie a magnetické rezonance v thalamické rovině: zvýšená echogenita nucleus lentiformis a inzuly u pacienta s Wilsonovou nemocí

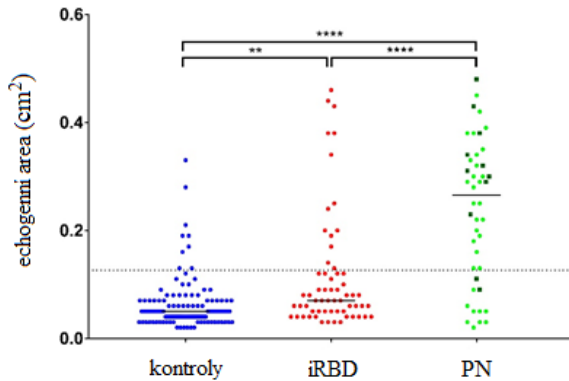
Neuropatologické studie u WN prokázaly, že hyperechogenita NL koreluje s putaminální koncentrací mědi, ale nikoli s obsahem železa.[18] Hromadění mědi a nasedající patologické procesy by tedy mohly vést ke změnám nejen na úrovni NL, ale i v inzulách. Obsah kovů v oblasti inzuly nebyl ve studii uveden, protože dosud nebyla tato struktura předmětem zájmu TCS. K lepšímu pochopení dynamiky vývoje echogenity inzuly u WN v čase by bylo nutné sériové TCS vyšetření.

S narůstajícím zájmem o uplatnění TCS v neurologii, se zlepšujícími se možnostmi zobrazení a fúze se dá očekávat zkoumání dalších nových mozkových struktur.

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

Výsledky:

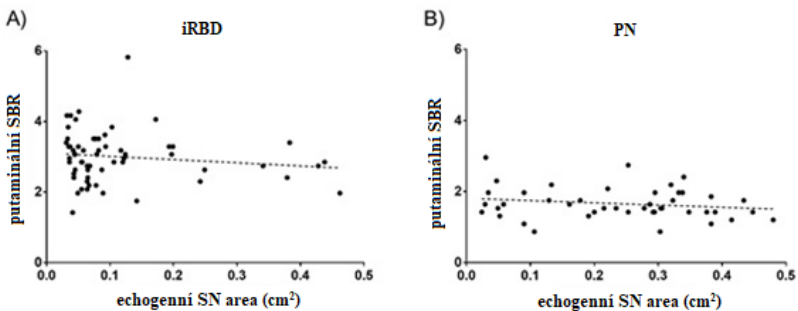
Abnormální pokles putaminálního vazebných indexů na DAT-SPECT byl přítomný u 25,4 % (n=16) pacientů s iRBD a u všech pacientů s PN (n=44). Abnormální SN area byla přítomna u 75,5 % pacientů s PN, u 23 % iRBD a u 7,3 % kontrol. Výskyt abnormálního nálezu u iRBD byl významně vyšší než u zdravých kontrol (OR 4,22 [95% interval spolehlivosti 1,75 – 10,22], $p = 0,0007$), ale zároveň významně nižší než u PN ($p < 0,0001$; viz Obr.3). Skupina PN byla kvůli posouzení vlivu RBD na echogenitu SN rozdělena do podskupin, které byly analyzovány odděleně. RBD příznaky byly diagnostikovány u 25 % pacientů s PN. Velikost SN arey se mezi podskupinami nelišila ($p=0.15$)



Obr.3 – Porovnání echogenní oblasti substantia nigra ve studijních skupinách (modrá: kontroly; červená: iRBD; tmavě zelené obdélníky: PN s RBD; světle zelené kruhy: PN bez RBD)

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 %; $p=0,28$). 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.4).

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 ($8,8 \pm 6,9$; $p=0,03$). Podrobnější korelační analýza prokázala asociaci mezi MDS-UPDRS-III a SN areou u iRBD ($r=0,27$; $p=0,045$) a mezi MDS-UPDRS-III a putaminálním SBR u PN ($r=-0,37$; $p=0,005$).



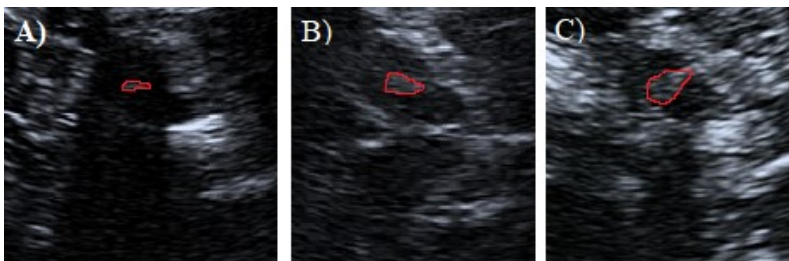
Obr.4 – Korelace mezi putaminálním vazebným indexem DAT-SPECT a substantia nigra ve skupině A) idiopatická forma poruchy chování v REM spánku (iRBD); B) Parkinsonova nemoc

Diskuze

Ačkoliv se SN echogenita mezi jednotlivými studovanými skupinami lišila (PN > iRBD > kontroly; viz Obr.3), bylo v naší studii procento abnormálních nálezů u iRBD nižší než v předchozích studiích (23 % vs. 32-63 %). Důvodem výrazného rozdílu hodnot může být odlišný princip hodnocení echogenity SN, nastavení ultrazvukového přístroje či metodika výběru iRBD pacientů. Námi použitý cut off (0,126cm²) byl stanoven zhodnocením výsledků dvou na sobě nezávislých hodnotitelů s vysokou inter-rater shodou.

Studie byla zaměřena také na porovnání TCS nálezů zohledňující přítomnost (PD+RBD) či absenci RBD příznaků u PN (PD-noRBD). 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.

Dle semikvantitativního zhodnocení bylo možné TCS 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.5).

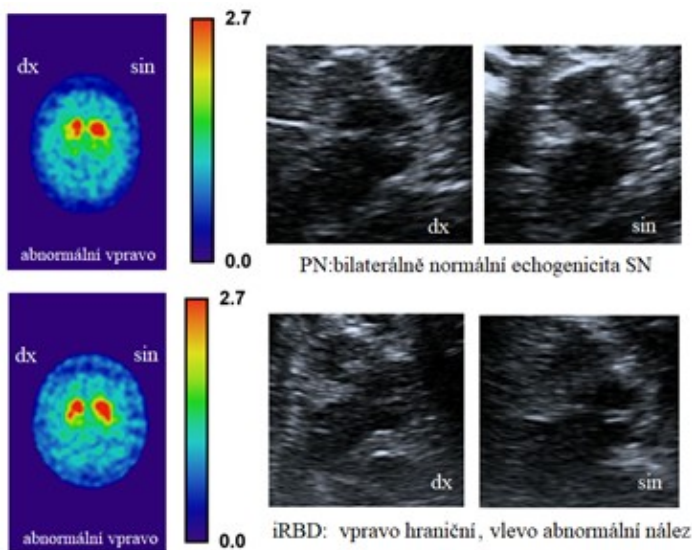


Obr.5 – Nálezy zachycené u pacientů s idiopatickou formou poruchy chování v REM spánku (iRBD): A) normální SN echogenita; B) hraniční SN echogenita; C) zvýšená hyperechogenita SN

Naše pozorování ukazují, že normální SN area bývá běžným nálezem u pacientů s iRBD, u kterých dochází k rozvoji parkinsonismu až s delším časovým odstupem. Echogenita SN ani v jedné ze zkoumaných skupin nekorelovala se sníženou hustotou dopaminergních transportérů. To potvrzuje i skutečnost, že u některých subjektů se abnormální nálezy na TCS a na DAT-SPECT stranově neshodovaly (viz Obr.6). Tyto závěry se shodují s dosud publikovanými studiemi.

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. Je možné, že hyperechogenní SN odráží pouze zranitelnost dané oblasti pro případné ukládání abnormálního α S. 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.



Obr.6 – 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)

V rámci vyloučení strukturálních lézí byla u všech subjektů provedena MR mozku. Opakovaným nálezem u iRBD byl redukovaný objem putamen,[19] což je nález obvykle pozorovaný u MSA. Ačkoliv je iRBD uznáváno jako prodromální fáze synukleinopatií, studie zkoumající u této diagnózy depozita železa nebo jiných kovů jsou velmi ojedinelé. Na R2* snímcích 3T MR nebyla v minulosti potvrzena kumulace železa, která by odlišovala pacienty s iRBD od zdravých osob.[20]. Na námi doplněných snímcích MR nebyla v místě SN, dle předběžného zhodnocení, pozorována zjevná akumulace železa. U některých pacientů byla vedlejším nálezem zvýšená vaskularizace v oblasti mezencefala. Na základě pilotních dat však nebylo možné zhodnotit, zda se jedná o novotvořené cévy nebo pouze o rozšíření perivaskulárních prostorů. Tento nález vyžaduje další zkoumání.

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.

6. 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 SN u pacientů s idiopatickou formou RBD, ale v rozporu s předchozími studiemi, byl abnormální nález (přesahující stanovený cut off) zjištěn pouze u menšiny pacientů. Při porovnání výsledků echogenity SN a DAT-SPECT byly výsledky více alterovány u pacientů s Parkinsonovou nemocí s projevy RBD než u skupiny idiopatické RBD. Echogenita SN arey se mezi pacienty s Parkinsonovou nemocí s projevy RBD a bez RBD nelišila.

7. Použitá literatura

1. Jellinger, K.A., *Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(3): p. 457-87.
2. Li, J., et al., *Ferroptosis: past, present and future*. Cell Death Dis, 2020. **11**(2): p. 88.
3. Imamura, A., Z. Wszolek, and R. Uitti, *Neurodegenerative overlap syndrome: Parkinsonism and motor neuron disorder*. Mov Disord, 2007. **22**(1): p. 151-2.
4. Hallgren, B. and P. Sourander, *The effect of age on the non-haemin iron in the human brain*. J Neurochem, 1958. **3**(1): p. 41-51.
5. Abbaspour, N., R. Hurrell, and R. Kelishadi, *Review on iron and its importance for human health*. J Res Med Sci, 2014. **19**(2): p. 164-74.
6. Dusek, P., et al., *The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases*. J Trace Elem Med Biol, 2015. **31**: p. 193-203.
7. Bressler, J.P., et al., *Metal transporters in intestine and brain: their involvement in metal-associated neurotoxicities*. Hum Exp Toxicol, 2007. **26**(3): p. 221-9.
8. Rottkamp, C.A., et al., *Redox-active iron mediates amyloid-beta toxicity*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(4): p. 447-50.
9. Walter, U., *Transcranial brain sonography findings in Parkinson's disease: implications for pathogenesis, early diagnosis and therapy*. Expert Rev Neurother, 2009. **9**(6): p. 835-46.
10. Walter, U., et al., *Sonographic detection of basal ganglia lesions in asymptomatic and symptomatic Wilson disease*. Neurology, 2005. **64**(10): p. 1726-32.
11. Berg, D., et al., *Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury*. Arch Neurol, 2002. **59**(6): p. 999-1005.
12. McGeer, P.L. and E.G. McGeer, *Glial reactions in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2008. **23**(4): p. 474-83.
13. Skoloudik, D., et al., *Transcranial sonography of the substantia nigra: digital image analysis*. AJNR Am J Neuroradiol, 2014. **35**(12): p. 2273-8.
14. Hogl, B., A. Stefani, and A. Videnovic, *Idiopathic REM sleep behaviour disorder and neurodegeneration - an update*. Nat Rev Neurol, 2018. **14**(1): p. 40-55.
15. Iranzo, A., et al., *Neurodegenerative disorder risk in idiopathic REM sleep behavior disorder: study in 174 patients*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89741.
16. Iranzo, A., et al., *Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study*. Lancet Neurol, 2006. **5**(7): p. 572-7.
17. Svetel, M., et al., *Transcranial sonography in Wilson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2012. **18**(3): p. 234-8.
18. Walter, U., et al., *Lenticular nucleus hyperechogenicity in Wilson's disease reflects local copper, but not iron accumulation*. J Neural Transm (Vienna), 2014. **121**(10): p. 1273-9.
19. Ellmore, T.M., et al., *Reduced volume of the putamen in REM sleep behavior disorder patients*. Parkinsonism Relat Disord, 2010. **16**(10): p. 645-9.
20. Lee, J.H., et al., *Evaluation of brain iron content in idiopathic REM sleep behavior disorder using quantitative magnetic resonance imaging*. Parkinsonism Relat Disord, 2014. **20**(7): p. 776-8.

8. Seznam publikací

Publikace in extenso, 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**
- 1) 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**
- 2) 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 tisku**

Ostatní práce:

- 1) 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**
- 2) 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**