

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Neurovědy



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Barbora Srpová

Roztroušená skleróza:

Klinické a paraklinické markery pro sledování aktivity nemoci

Multiple sclerosis:

Clinical and paraclinical markers of disease activity

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Dana Horáková, 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, 13.12.2020

Barbora Srpová

Poděkování:

Nejprve bych ráda poděkovala své školitelce, doc. MUDr. Daně Horákové, Ph.D., za excelentní vedení po celou dobu mého postgraduálního studia a pomoc při přípravě této disertační práce. Taktéž celé naší vědecké skupině, jmenovitě především doc. Tomáši Uherovi, Ph.D., MUDr. Petře Nytrové, Ph.D., MUDr. Karolíně Vodehnalové, MUDr. Michaele Andělové a prof. MUDr. Evě Kubala Havrdové, CSc., za jejich skvělou spolupráci v rámci výzkumné i pracovní aktivity.

Dále bych chtěla z celého srdce poděkovat svým nejbližším, a to svému manželovi, Martinu Srpovi, za obrovskou podporu, pomoc a lásku, rodičům, Aleně a Miroslavu Beňovým, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout, a nakonec svému synovi, Štěpánu Srpovi, díky němuž za touto prací stojí nejen velké vědecké úsilí, ale také osobní vůle.

Identifikační záznam

SRPOVA, Barbora, *Roztroušená skleróza: Klinické a paraklinické markery pro sledování aktivity nemoci [Multiple sclerosis: Clinical and paraclinical markers of disease activity]*. Praha, 2020, 75 s, 6 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Neurologická klinika. Vedoucí práce doc. MUDr. Horáková Dana, Ph.D.

Abstrakt

Roztroušená skleróza (RS) je autoimunitní, neurodegenerativní onemocnění centrálního nervového systému. V současnosti máme pouze omezené markery vypovídající o aktivitě onemocnění a schopné predikovat budoucí průběh nemoci u pacientů s RS. Tato práce se zabývá dvěma potenciálními markery. Prvním z nich je řeč, jejíž parametry jsme hodnotili v kohortě o 141 pacientech a 70 zdravých kontrol. Pomocí akustické analýzy jsme prokázali přítomnost řečových abnormalit již u pacientů s minimálním neurologickým postižením (EDSS<2) a korelaci těchto odchylek s regionální i celkovou mozkovou atrofií. Hlavní část práce je věnována lehkým řetězcům neurofilament (NfL), především jejich sérovým hladinám (sNfL) jakožto v současnosti nejslibnějšího markeru nejen pro sledování aktivity onemocnění, ale také zhodnocení efektu terapie a predikce průběhu nemoci. Cílem bylo objasnit význam tohoto parametru a jeho možné uplatnění v běžné klinické praxi. V kohortě 172 nově diagnostikovaných pacientů byly stanoveny sérové a likvorové hladiny NfL společně s klinickým vyšetřením a magnetickou rezonancí mozku. Nejdůležitějšími závěry naší práce byly průkaz NfL jako markeru probíhajícího zánětu CNS (zánětlivé neurodegenerace), potažmo aktivity nemoci, a zároveň jako prediktivního markeru budoucí mozkové atrofie. Dále jsme se zaměřili na posouzení významu hladin NfL s ostatními biochemickými parametry. Prokázali jsme úzký vztah vysoké hladiny sNfL s poruchou bariéry a asociace nízkých hladin apolipoproteinů ApoA-I a ApoA-II s vysokými hladinami NfL.

Klíčová slova: roztroušená skleróza, biomarkery, lehké řetězce neurofilament, řeč

Abstract

Multiple sclerosis is chronic, autoimmune and neurodegenerative disorder of central nervous system. Currently, we have only limited markers of disease activity. From clinical markers, speech markers were analysed. Data from 141 patients and 70 healthy controls were evaluated. The most important results were detection of speech abnormalities in patients with minimal neurological disability (EDSS<2) and their correlations with global and regional brain atrophy. This work is predominantly concentrated on neurofilament light chain (NfL) as one of the most promising paraclinical biomarkers. NfL, especially level of serum NfL (sNfL), is considered to be a biomarker of future disease course, disease activity and effect of DMD (disease modifying drugs) therapy. The main aim was to clarify the position of NfL among others biomarkes and their potential benefit for routine clinical praxis. MRI data, clinical data and results of NfL measurements from 172 newly diagnosed patients with relaps-remiting MS (revised McDonald criteria 2017) from original SET cohort were analysed. Additionally, we compared levels of serum and CSF NfL with other biochemical parameters, such as lipidogram and markers of blood-brain permeability. We found sNfL as a marker of ongoing neuroinflammation and predictor of future brain atrophy in patients with early MS. Furthermore, relation of sNfL with blood-brain barrier dysfunction and parameters of lipidogram were established.

Key words: multiple sclerosis, biomarkers, neurofilament light chain, speech

Seznam zkratek

25FWT – 25 - Foot Walk Test

9HPT – 9 - Hole Peg Test

AIC – Akaike Information Criterion

Anti-VCA IgG – protilátky proti virovému kapsidovému antigenu viru Epstein-Barrové

APC – Antigen Presenting Cells

Apo – Apolipoprotein

ApoA-I – Apolipoprotein A I

ApoA-II – Apolipoprotein A II

BDI – Beck Depression Inventory

BICAMS – Brief International Cognitive Assessment for MS

BPF – Brain Parenchymal Fraction

CCF – Corpus Callosum Fraction

CCV – Corpus Callosum Volume

CIS – Clinically Isolated Syndrome

CNS – Centrální Nervový Systém

DIS – Dissemination in Space

DIT – Dissemination in Time

DMD – Disease Modifying Drugs

EAE – Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

EBV – virus Epstein-Barr

ECL – Elektrochemiluminiscence

EDSS – Expanded Disability Status Scale

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FLAIR – Fluid-Attenuated Inversion Recovery

GAD – Gadolinium

GMF – Grey Matter Fraction

GMV – Grey Matter Volume

HDL-C – High Density Lipoprotein Cholesterol

HEB – Hematoencefalická Bariéra

HLA DRB1*1501 – Human Leukocyte Antigen DRB1*1501

ICV – IntraCranial Volume

IEF – Isoelektrická fokusace

IgG – Immunoglobulin G

IgM – Immunoglobulin M

IL-17 – Interleukin-17

IQR – InterQuartile Range

LDL-C – Low Density Lipoprotein Cholesterol

LoD – Limit of Detection

LoQ – Limit of Quantification

MR – Magnetická Rezonance

MSFC – Multiple Sclerosis Functional Composite

MS – Multiple Sclerosis

NfL – lehké řetězce neurofilament

PASAT – Paced Auditory Serial Addition Test

PP RS – Primárně Progresivní Roztroušená Skleróza

Q_{Alb} – albuminový kvocient

RBN – Retrobulbární Neuritida

RR RS – Relaps Remitentní Roztroušená Skleróza

RS – Roztroušená Skleróza

SDMT – Symbol Digit Modalities Test

SET – Study of Early Interferon beta-1a Treatment

sNfL – sérové lehké řetězce neurofilament

SP RS – Sekundárně Progresivní Roztroušená Skleróza

T1/T2LV – T1/T2 Lesion Volume

T1-WI/FFE 3D – T1-Weighted 3-Dimensional Fast Field

TNF alfa – Tumor Necrosis Factor alfa

WBV – Whole Brain Volume

WMV – White Matter Volume

Obsah

1. Úvod	12
1.1. Roztroušená skleróza	12
1.2. Etiopatogeneze RS	14
1.3. Biomarkery	16
1.3.1. Klinické markery	18
1.3.1.1. Řeč	18
1.3.2. Paraklinické markery	19
1.3.2.1. Lehké řetězce neurofilament	20
2. Cíle práce a hypotézy	26
3. Metodika	27
3.1. Řeč	27
3.2. NfL	28
3.2.1. Pacienti	28
3.2.2. Měření hladin NfL	28
3.2.3. Stanovení dalších laboratorních parametrů	29
3.2.4. Klinické vyšetření	30
3.2.5. Magnetická rezonance	30
3.2.6. Statistická analýza	31
4. Výsledky	34
4.1. Řeč	34
4.2. NfL	38
4.2.1. Základní demografie, asociace mezi sNfL a baselinovými parametry	38
4.2.2. Hladina sNfL v průběhu 3letého sledování	41
4.2.3. Vztah mezi vývojem sNfL a ostatními parametry (klinickými a rezonančními) v průběhu 3letého sledování	43
4.2.4. sNfL jako prediktor	45
4.2.5. NfL a lipidogram	48
4.2.6. NfL a ostatní laboratorní parametry	49
4.2.7. sNfL jako marker radiologické aktivity nemoci	51
4.2.8. sNfL a NEDA-3 v průběhu 4letého sledování	52

5. Diskuze	54
5.1. Řeč	54
5.2. NfL	55
6. Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz	61
6.1. Řeč	61
6.1.1. Závěry	61
6.1.2. Zhodnocení cílů a hypotéz	61
6.2. NfL	62
6.2.1. Závěry	62
6.2.2. Zhodnocení cílů a hypotéz	62
7. Souhrny	63
7.1. Souhrn	63
7.2. Summary	64
8. Seznam literatury	65
9. Seznam publikací	74
9.1. Seznam publikací in extenso, které jsou podkladem práce	74
9.2. Seznam publikací in extenso, které nejsou podkladem práce	75

1. Úvod

1.1. Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je autoimunitní, zánětlivé a neurodegenerativní onemocnění centrálního nervového systému postihující především mladé dospělé, u kterých patří mezi nejčastější příčiny disability (Compston and Coles 2008). Řadí se mezi tzv. demyelinizační onemocnění, jejichž je nejčastějším zástupcem.

V současné době je prevalence onemocnění v České republice odhadována na 200/100 000 s incidencí 11,7/100 000/rok (Havrdová 2013, www.multiplesclerosis.cz). Na vzrůstající incidenci se jistě kromě vlastního zvyšování výskytu onemocnění podílí také včasnější a lepší diagnostika. První obtíže se nejčastěji vyskytují mezi 20. – 40. rokem věku, mohou se objevit ale již v dětství či po 50. roce života. Jelikož postihuje především mladé dospělé, má RS značný nejen sociální, ale také ekonomický dopad (Kobelt et al. 2017). Častěji se onemocnění vyskytuje u žen, a to poměrem 3:1.

Obecně můžeme klinický průběh nemoci rozdělit na 4 varianty: relaps-remitentní, sekundárně progresivní, primárně progresivní a progredující-relabující. Relaps-remitentní RS (RR RS) je nejčastější variantou, kde jsou relapsy (ataky) střídány obdobím remise. Tato forma následně v průběhu několika let (u přirozeného průběhu nemoci kolem 10 let) přechází do sekundárně progresivní RS (SP RS) (Kremenutzky et al. 2006). Primárně progresivní RS (PP RS) tvoří přibližně 10-15 % případů. Neprojevuje se relapsy, ale již od začátku onemocnění dochází k postupné progresi a nárůstu disability. Nejméně častou a nejzávažnější variantou je progredující-relabující RS, která se vyznačuje progresí od počátku nemoci se současnými relapsy.

Klinicky se onemocnění může projevovat vysoce variabilními neurologickými obtížemi. Mezi nejčastější první obtíže typicky patří zánět očního nervu neboli retrobulbární neuritida (RBN), senzitivní symptomatika charakteru parestezií/hypestezií či motorický deficit. Charakter prvních obtíží či následných relapsů můžeme dělit také dle topiky, a to na supratentoriální, kmenové, míšní či zrakové.

V současnosti se diagnostika skládá ze třech hlavních částí: klinický obraz, nález na magnetické rezonanci (MR) a výsledek likvorologického vyšetření. V roce 2017 byla

vydána nová revidovaná McDonaldova kritéria, která upravují dosavadní diagnostický přístup (Thompson et al. 2018) (Tabulka 1).

Tabulka 1. Revidovaná diagnostická McDonaldova kritéria z r. 2017

Klinická kritéria (ataky)	Objektivní klinický průkaz (léze)	Další údaje potřebné ke stanovení diagnózy
≥2	≥2	Žádné
≥2	1 (stejně jako anamnestický důkaz předchozí ataky s lézí v odlišném anatomickém místě)	Žádné
≥2	Objektivní klinický průkaz 1 léze	DIS (diseminace v prostoru) s průkazem další ataky lokalizované jinde klinicky nebo MR
1	Objektivní klinický průkaz ≥2 léze	DIT (diseminace v čase) dokumentovaná další atakou nebo MR NEBO nálezem oligoklonálních pásů v likvoru
1	Objektivní klinický průkaz 1 léze	DIS (diseminace v prostoru) dokumentovaná další atakou z jiného místa CNS nebo na MR a DIT (diseminace v čase) dokumentovaná další atakou nebo MR NEBO pozitivním nálezem oligoklonálních pásů v likvoru
0 (progrese od počátku)		Rok progrese nemoci (retrospektivně nebo prospektivně) PLUS nejméně dvě následující kritéria: 1 či více T2 hyperintenzních lézí typických pro RS v mozkové oblasti periventrikulární, juxtakortikální/kortikální nebo infratentoriální; 2 či více T2 hyperintenzních lézí v míše, přítomnost oligoklonálních pásů v likvoru

Jednou ze zásadních změn je zahrnutí kortikálních a symptomatických lézí na MR, které nově mohou být brány v potaz při zhodnocení diseminace v prostoru (DIS). Další podstatnou změnou je akceptace oligoklonálních pásů (OCB), jež jsou považovány za marker diseminace v čase (DIT). V případě, že pacient splní podmínky diseminace v prostoru i čase, jedná se o definitivní roztroušenou sklerózu (CDMS). Při uplatnění nových diagnostických kritérií již pacient s prvním klinickým příznakem, splňující kritérium diseminace v prostoru na MR a prokázanou oligoklonální syntézou (≥2 nekorespondující pásy v likvoru), není považován za pacienta s klinicky izolovaným

syndromem (CIS), ale mluvíme již o CDMS. Důraz je kladen na charakter prvních příznaků, které musí být typické pro RS. Terapii RS dělíme na dvě hlavní části, na léčbu ovlivňující patofyziologickou podstatu onemocnění (akutní a chronická) a na léčbu symptomatickou.

Akutní terapie je používána k léčbě relapsů. Nejčastěji je podáván intravenózní pulz methylprednisolonu (Solumedrol) v dávce 3-5 g, s eventuálním následným taperem Medrolu či Prednisonu. Při závažných relapsech se značným neurologickým deficitem a špatnou odpovědí na kortikoterapii může být indikována série plazmaferéz či podání pulzu cyklofosfamidu. K dlouhodobé terapii u pacientů s RR RS jsou používány tzv. disease modifying drugs (DMD) neboli léky ovlivňující přirozený průběh onemocnění. Prvním DMD preparátem, který byl v České republice registrován pro terapii RS, byl v r. 1996 interferon beta. V současnosti terapii DMD dělíme na 2 hlavní kategorie: 1. preparáty určené pro pacienty s nižší aktivitou nemoci (interferony, glatiramer acetát, teriflunomid a dimethyl fumarát) a 2. preparáty pro pacienty s vyšší aktivitou nemoci (fingolimod, natalizumab, ocrelizumab, cladribin a alemtuzumab).

Cílem symptomatické terapie je především ovlivnění svalové hyperaktivity, únavy, neuropatické bolesti a dalších doprovodných symptomů, které mají zásadní vliv na kvalitu života pacienta.

Nedílnou součástí terapie RS jsou také nefarmakologické metody (fyzioterapie, ergoterapie, psychoterapie, kognitivní trénink) a změna životního stylu pacienta, jehož podstatou je absolutní absence kouření, pravidelná fyzická aktivita (s ohledem na tělesný stav a možnosti každého pacienta) a vyvarování se nadměrné stresové zátěži.

1.2. Etiopatogeneze RS

Roztroušená skleróza je multifaktoriální, heterogenní onemocnění, na jehož vzniku se podílí environmentální faktory (např. expozice UV záření, kouření, perzistující EBV infekce, složení mikrobiomu), které mohou plnit úlohu tzv. „trigger pointů“ (spouštěčů) u geneticky predisponovaných jedinců (Dendrou, Fugger, and Friese 2015). I přes tyto poznatky však přesná etiopatogeneze RS není plně objasněna.

Z důvodu nezpochybnitelné klíčové úlohy zánětu v patofyziologii onemocnění, je roztroušená skleróza považována za primárně zánětlivé autoimunitní onemocnění vedoucí

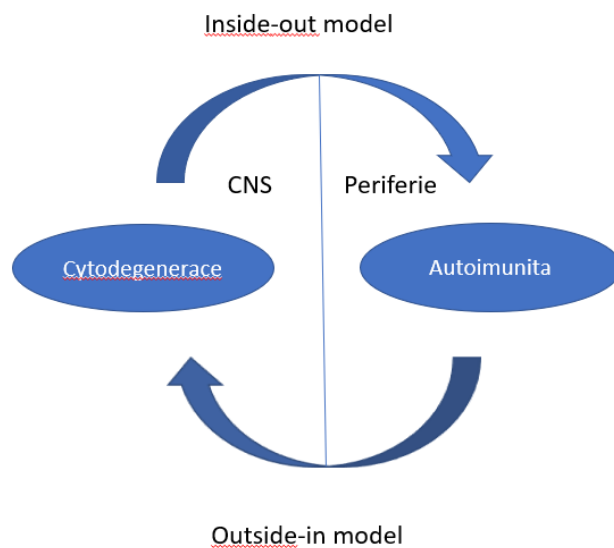
k pozdější neurodegeneraci (Trapp et al. 1998). Byl prokázán blízký vztah onemocnění s imunoregulačními geny a současně byly částečně objasněny procesy axonálního poškození způsobeného autoreaktivními lymfocyty a makrofágy (Herz, Zipp, and Siffrin 2010). Na průkazu patologické autoimunitní odpovědi se zásadní měrou podílelo vytvoření modelu experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE) (Lassmann 2004). Tento animální model je založen na podání antigenu myelinu (např. bazického myelinového proteinu – BMP) společně s imunologickým boosterem hlodavcům, kteří následně rozvinou obraz EAE. Model i přes své nedostatky přispěl mezi léty 1950–2005 k ozřejmění mnohých imunopatologických procesů a podílel se zásadní měrou na vzniku a rozvoji imunomodulační léčby RS (Trapp and Nave 2008, Sriram and Steiner 2005). Pomocí modelu EAE byla prokázána zásadní úloha T regulačních lymfocytů (Treg) a především specifického subtypu pomocných Th17 lymfocytů, které jsou Treg řízeny. Samotné vyžívání Th17 lymfocytů je však regulováno dendritickými buňkami na periférii a mikroglíí v CNS. Nejdůležitějšími prozánětlivými cytokiny, které Th17 lymfocyty produkují, jsou tumor necrosis factor alfa (TNF alfa) a interleukin 17 (IL-17). Dle současných zjištění se IL-17 podílí na patologické imunitní odpovědi především aktivací matrixové metaloproteinázy 3, která působí poškození hematoencefalické bariéry, a tím také následně poruchu její permeability (Havrdová 2013). Klíčová úloha IL-17 je velice komplexní a podílí se v řadě patologických interakcí, které nejsou všechny zcela objasněny.

Celá tato koncepce je podkladem tradičního tzv. „outside-in“ modelu, vysvětlujícího možnou etiologicko-patofyziologickou podstatu onemocnění na základě imunitní dysregulace (Obrázek 1). Jeho podstatou je hypotéza o vzniku autoreaktivních T lymfocytů na periférii, které prostupují přes hematoencefalickou bariéru (HEB) do CNS a společně s dalšími elementy adaptivní i vrozené imunity (B lymfocyty, makrofágy) způsobují neuronální poškození ústící v demyelinizaci a následné axonální poškození s axonální transekcí (Stys et al. 2012).

Opačným, minoritním přístupem je pohled na RS jakožto primárně neurodegenerativní onemocnění (Heneka, Kummer, and Latz 2014). V několika pracích bylo prokázáno, že k neurodegeneraci dochází již od samotného počátku onemocnění, a není tedy důsledkem pouze samotného zánětlivého procesu. Na základě těchto zjištění, jako opak k tradičnímu „outside-in“ modelu, byl popsán tzv. „inside-out“ model (Obrázek 1). Jeho základem je

představa vzniku prvotní dysfunkce v CNS analogicky jako u klasických neurodegenerativních onemocnění. Model předpokládá buněčné poškození, které způsobí uvolnění značné části antigenů do periferie, které následně způsobí u predisponovaného jedince rozvoj autoreaktivní imunitní odpovědi (Trapp and Nave 2008).

Obrázek 1. Koncept Outside-in vs. Inside-out modelu



S modely „inside-out“ a outside-in se v patogenezi RS můžeme také setkat ve vztahu axonálního a myelinového poškození v užším slova smyslu. Tedy v souladu s výše uvedenými modely (cytodegenerace vs. autoimunita, resp. CNS vs. periferie) je uváděna hypotéza myelinového poškození vedoucího k axonální transekci (tradiční „outside-in“ model) a vice versa hypotéza vzniku léze od axonálního poškození k myelinovému („inside-out“ model) (Tsunoda and Fujinami 2002).

1.3. Biomarkery

V současné době jednou z hlavních oblastí výzkumu na poli roztroušené sklerózy je detekce potenciálních markerů, které by nám pomohly v přesnější diagnostice, stanovení prognózy

onemocnění, sledování aktivity nemoci a zhodnocení efektu terapie. Obecně markery, které vypovídají o průběhu onemocnění či slouží k hodnocení efektu terapie a jsou objektivně měřitelné, označujeme jako tzv. biomarkery (Bielekova and Martin 2004). Potřeba těchto biomarkerů je u RS potencována především její výraznou interindividuální, ale i intraindividuální variabilitou. V současnosti neumíme RS kauzálně vyléčit, ale umíme ji efektivně léčit pomocí řady heterogenních protizánětlivých preparátů s odlišným mechanismem účinku. Jedním ze současných výzkumných cílů je individualizovaná medicína, za účelem stratifikace pacientů ve vysokém riziku rychlé progresse nemoci, u kterých je nezbytná včasná agresivní farmakoterapie již od počátku nemoci, která zabrání ireverzibilní ztrátě neuronů/axonů a rozvoji brzké disability.

Prostředkem této individualizované medicíny jsou právě biomarkery, které nám mohou sloužit jako tzv. „surrogate markery/endpointy“, jež jsou schopné nahradit/predikovat budoucí aktivitu nemoci. Dle práce zabývající se biomarkery u RS od Bielekova a Martina je vhodné používat označení „surrogate endpoint“ namísto „surrogate marker“, avšak z důvodu častého použití v odborné literatuře jsou zde uvedeny oba pojmy (Bielekova and Martin 2004). V klinických studiích mezi nejčastěji používané klinické „surrogate markery/endpointy“ patří počet relapsů či potvrzená progresse hodnocená dle EDSS (Expanded Disability Status Scale), což znamená zhoršení o 1 bod v EDSS po dobu min. 6 měsíců. Z paraklinických markerů/endpointů se nyní využívají především rezonanční parametry, a to zhodnocení lezionální patologie a nárůst mozkové atrofie (blíže viz 1.3.2). Je však potřeba nalezení dalších markerů, které by lépe reflektovaly nejen efekt uvažované terapie, ale také predikovaly event. progresi onemocnění. Mezi předpokládané vhodné „surrogate markery/endpointy“ v klinických studiích patří v současné době především sérové hladiny lehkých řetězců neurofilament (sNfL) (Sormani et al. 2019).

Další důležitou kategorií jsou tzv. „klinické outcomes“, které představují významné a měřitelné proměnné, jež reflektují tíži disability pacienta. V poslední době se mezi tyto parametry řadí také průceschopnost pacienta, která se ukazuje být praktickým a objektivním markerem reflektujícím komplexní disability pacienta (Benova et al. 2016, Kadrnozkova et al. 2018).

Jak již bylo naznačeno výše, biomarkery u roztroušené sklerózy můžeme rozdělit do 2 hlavních skupin, a to na markery klinické a paraklinické. Obě skupiny jsou velice rozsáhlé a obsahují celou řadu parametrů.

1.3.1. Klinické markery

Častým cílem výzkumu na poli klinických markerů je snaha o nalezení specifických a senzitivních markerů disability. V současnosti je v běžné klinické praxi pro hodnocení disability, i přes její značné nedostatky, nejčastěji používána Kurtzkeho škála EDSS (Kurtzke 1983). Mezi její největší nevýhody patří především nedostatečné zhodnocení kognice a funkce horní končetiny. Již od zavedení Kurtzkeho škály byly tendence k vytvoření podrobnějšího hodnocení či přidání dalších kvantitativních funkčních testů, které by lépe odrážely komplexní disabilitu pacienta. Avšak zatím žádný není běžně používán v rutinní praxi jako EDSS. Asi nejznámějším z nich je kompozitní skóre MSFC (Multiple Sclerosis Functional Composite), které obsahuje tři subtesty pro zhodnocení funkce ruky (9-Hole Peg Test – 9HPT), kognice (Paced Auditory Serial Addition Test – PASAT) a chůze (25-Foot Walk Test – 25FWT) (Fischer et al. 2001). Dalším rozšířeným kognitivním testem, jenž hodnotí procesní rychlost paměti, je Symbol Digit Modalities Test (SDMT), který je součástí baterie testů BICAMS (Brief International Cognitive Assessment for MS). Všechny tyto funkční testy jsou používány pravidelně v klinických studiích, ale jejich zavedení do běžné klinické praxe brání časová náročnost a zatím ne zcela jasná validace pro rutinní praxi.

1.3.1.1. Řeč

Mezi málo prozkoumané parametry u pacientů s RS patří řeč, které se v současnosti začíná věnovat více pozornosti jako možnému klinickému markeru. (Konstantopoulos et al. 2010, Hartelius and Lillvik 2003). Zhodnocení jednotlivých aspektů řeči může potenciálně identifikovat nové klinické parametry, které by mohly přinést zlepšení ve sledování nemoci a přesnější popis klinického obrazu aktivity onemocnění. Doposud předpokládaný výskyt dysartrie, bez ohledu na jednotlivé typy dysartrie, byl kolem 40-50% (Hartelius, Runmarker, and Andersen 2000). Za nejčastěji se vyskytující dysartrie u pacientů s RS byly považovány spastická a ataktická dysartrie či jejich kombinace.

Velkou úlohu v hodnocení řeči a zkoumání jejích základních komponent (fonace, orální diadochokineza, artikulace a prosodie) hraje záznam řeči a její následná akustická analýza, která umožňuje její podrobné zhodnocení a posouzení 10 dimenzí, které jsou typické pro jednotlivé řečové komponenty (Rusz et al. 2017).

1.3.2. Paraklinické markery

Mezi paraklinické markery řadíme prakticky veškeré ostatní markery od rezonančních až po laboratorní.

Parametry magnetické rezonance jsou v současné době nejrozšířenějšími markery jak ve sledování aktivity nemoci, tak v jejich použití jako tzv. „surrogate endpointů“ (blíže viz 1.3.). Jedná se především o parametry tzv. lezionální patologie, tedy ložiskového poškození, které jsou obrazem převážně zánětlivé aktivity onemocnění. Patří mezi ně zhodnocení celkového objemu a počtu T1 a T2 lézí, počet tzv. „black holes“ na T1 vážených obrazech a počet gadolinium enhancujících lézí.

Další velkou skupinu rezonančních parametrů tvoří parametry volumetrické, sloužící k hodnocení míry atrofie, a to jak celkové, tak regionální. Ke stanovení volumetrických parametrů slouží četné komerční i výzkumné softwary (např. ScanView, SIENA/X, FreeSurfer). Problémem volumetrického měření je však jeho přesnost a reprodukovatelnost získaných výsledků. Při longitudinálním sledování je nezbytné provádět vyšetření na stejném MR přístroji za co možná nejvíce standardizovaných podmínek a výsledky analyzovat identickým softwarem. I přes složitější management mají volumetrické markery značný potenciál v hodnocení progresu onemocnění a jejich užití jako prognostického markeru budoucí disability (Horakova et al. 2012, Uher et al. 2015, Andelova et al. 2019).

Laboratorní markery můžeme rozdělit na dvě nejdůležitější kategorie, a to parametry likvorové a sérové. Jedním z nejzásadnějších likvorových markerů jsou oligoklonální pásy (OCB), pro jejichž stanovení je nejvhodnější metodou isoelektrická fokusace (IEF). Již v roce 1983 se pozitivita OCB v likvoru stala součástí tzv. Poserových diagnostických kritérií, i když t.č. pouze ve formě „pomocné“ vyšetřovací metody (Poser et al. 1983). Diagnostická senzitivita stanovení OCB metodou IEF je >95 % se současně nižší specificitou kolem 86 %. Ve srovnání s OCB, méně spolehlivým parametrem, je index IgG s výrazně nižší senzitivitou okolo 75% (Freedman et al. 2005). Dalším z používaných diagnostických likvorových markerů jsou volné řetězce kappa (κ), včetně jejich indexu, jejichž zvýšení je typické pro pacienty s diagnózou RS (Presslauer et al. 2008).

Mnohé další potenciální likvorové markery jsou v současnosti zkoumány. Mezi nejslibnější patří např. chitinas 3-like 1 protein (CH3L1), u níž bylo prokázáno, že její zvýšená hladina u pacientů s CIS je spojená s vyšším rizikem konverze do definitivní roztroušené sklerózy.

CH3L1 může tedy potenciálně sloužit jako prognostický marker (Comabella et al. 2010). Z biomarkerů stanovených z periferní krve jsou t.č. nejslibnější neurofilamenta, a to především jejich lehké řetězce (blíže viz 1.3.2.1).

Důležitou roli v hledání nových laboratorních biomarkerů hrají zásady tzv. správného „biobankingu“ neboli dlouhodobého uskladňování vzorků tělesných tekutin. Adekvátní postup, včetně správného odběru mozkomíšního moku a zpracovávání vzorků před samotným zamrazením, popsali Teunissen et al. v roce 2009 (Teunissen, Petzold, et al. 2009). Vzorky by měly být zpracovávány za pokojové teploty, centrifugovány při stejných otáčkách a alikvotovány o totožných objemech do polypropylenových zkumavek. Veškeré preanalytické zpracování by nemělo trvat déle než 1 hodinu. Základem dlouhodobého biobankingu je uskladnění vzorků v -80 °C.

1.3.2.1. Lehké řetězce neurofilament

Neurofilamenta jsou proteinové polymery, které se řadí do kategorie intermediárních filament o velikosti 10nm a tvoří výraznou součást cytoskeletu neuronu (společně s mikrofilamenty a mikrotubuly), v němž plní nejen strukturální funkci, ale také transportní (Hoffman and Lasek 1975). Předpokládanou podstatnou úlohou neurofilament je regulace průměru axonu, a tím následně také ovlivnění rychlosti vedení nervového vzruchu (Yuan, Rao, and Nixon 2017).

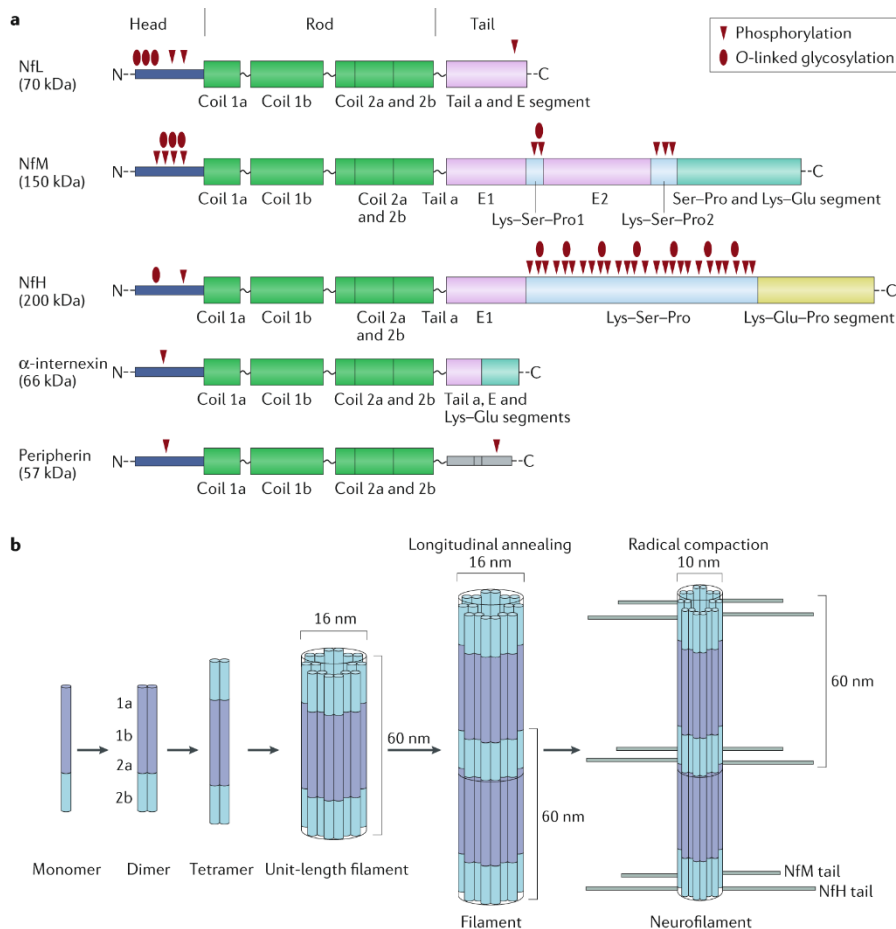
Neurofilamenta jsou tvořena základní triádou/tripletem neurofilament: 1. lehkými řetězci neurofilament (NfL) o molekulové hmotnosti 70kDa, 2. středními řetězci neurofilament (NfM) o hmotnosti 150 kDa a 3. těžkými řetězci neurofilament (NfH) o molekulové hmotnosti 200 kDa. Dalšími 2 minoritními typy neurofilament jsou proteiny alfa-internexin a peripherin, který se téměř výhradně vyskytuje pouze v periferních neuronech. Základní triáda společně s alfa-internexinem se řadí do IV. skupiny intermediárních filament, naopak peripherin je řazen do skupiny III.

Jednotlivé monomery neurofilament vytváří homodimery či heterodimery predilekčně v kombinaci s NfL, které se v neuronech vyskytují nejčastěji. Následně dochází k tvorbě tetramerů, které jsou považovány za základní stavební jednotku konečného filamenta. Poměr jednotlivých typů neurofilament a také celkové množství neurofilament se však liší dle charakteru neuronu a také dle vývojové fáze. Např. v periferním neuronu se snižuje

koncentrace neurofilament od proximálního segmentu k distálnímu, a naopak v optickém nervu se množství distálněji zvyšuje, a to až trojnásobně (Yuan et al. 2017). Ve vyzávajícím neuronu CNS je typicky převaha peripherinu s minimálním množstvím NfH, v dospělém neuronu se tento poměr obrací. Pro vyvíjející se neurony je také typický výskyt třech dalších typů intermediárních filament, a to vimentinu, nestinu a syneminu, které se již v dospělém neuronu nevyskytují či se vyskytují ve zcela nepatrném množství. Obecně lze říci, že relativní zastoupení jednotlivých typů neurofilament v dospělých neuronech CNS je 7:3:2 (NfL:NfM:NfH) (Janmey, Leterrier, and Herrmann 2003). Podrobná stavba polymeru neurofilament však doposud nebyla popsána, a to především z důvodu absence krystalické struktury, kterou se doposud nepodařilo vytvořit. Podstatnou roli v absenci krystalické struktury hraje především výrazná variabilita neurofilament. Souhrnně lze říci, že NfL tvoří jádro celé struktury. NfM společně s NfH jsou uloženy periferněji a jejich karboxylové terminální konce vystupují do prostoru (Obrázek 2) (Khalil et al. 2018, Yuan et al. 2017).

Důležitou úlohu ve stavbě a také v laboratorní detekci neurofilament hrají fosforylační místa, na která se váží fosfátové skupiny. NfL jsou minimálně fosforylované (fosforylační místa se nacházejí především na N-terminálním konci a jejich úloha je předpokládána především v konečném uspořádání polymeru), naopak NfM a především NfH obsahují desítky fosforylačních míst na svém karboxylovém terminálním konci. Důležitá role fosforylace je předpokládána nejen v samotné funkci neurofilament, ale také v patogenezi neurodegenerativních onemocnění (Yuan, Rao, and Nixon 2017).

Obrázek 2. Struktura neurofilament



Obrázek převzat z publikace Khalil et al. 2018.

Z důvodu absence většího počtu fosforylovaných míst a četného zastoupení v neuronech ve srovnání s ostatními neurofilamenty, patří NfL v současnosti mezi nejslibnější biomarkery napříč neurologickými diagnózami.

Velký potenciál NfL jakožto biomarkeru u pacientů s RS je již znám od roku 1998 (Fuchs and Cleveland 1998). Od té doby probíhal intenzivní výzkum zabývající se přesnou strukturou, posttranslační modifikací, funkcí a úlohou v patogenezi nejen roztroušené sklerózy, ale napříč všemi neurodegenerativními onemocněními (Szaro and Strong 2010, Al-Chalabi and Miller 2003). Opakovaně bylo v minulosti navrhováno jejich využití v klinické praxi, bohužel z důvodu značné limitace dané laboratorním stanovením NfL nebylo jejich plné využití až donedávna možné (Fialova et al. 2013). Pomocí analýzy hladin NfL v likvoru rutinně dostupnou metodou ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent

Assay; Uman Diagnostics, t.č. již UE:CE certifikováno) byla již několikrát zkoumána jejich schopnost možné predikce klinické či rezonanční progresy/aktivity onemocnění (Teunissen, Iacobaeus, et al. 2009, Teunissen and Khalil 2012, Comabella and Montalban 2014).

Jako první byl Lycke et al., který v roce 1999 prokázal zvýšené hladiny NfL v likvoru u pacientů s RR RS a jejich korelaci s klinickou aktivitou (Lycke et al. 1998). V roce 2010 se Salzer et al. zaměřili na predikci doby konverze do sekundární progresy a tíže disability po průměrně 14letém sledování (rozmezí 8-20 let) pomocí hladin NfL v diagnostické lumbální punkci. Dle likvorových hladin NfL rozdělili pacienty do 3 skupin (>386 ng/l, 60-386 ng/l a <60 ng/l). Skupina s nejvyšší hladinou NfL (>386 ng/l) měla 5x vyšší riziko závažnějšího průběhu RS (OR 5,2; 95%CI 1,8-15) a pravděpodobnější přechod do sekundární progresivní fáze než předchozí dvě skupiny ($p < 0,01-0,03$) (Salzer, Svenningsson, and Sundstrom 2010). Novější práce od Bhan et al. potvrdila potenciál likvorových hladin NfL v predikci rizika přechodu do SP RS v průběhu 10letého sledování (Bhan et al. 2018). Na druhou stranu i přes tyto pozitivní výsledky několik prací prokázalo nedostatečnou sílu likvorových hladin NfL predikovat přechod z CIS do definitivní RS (Arrambide et al. 2016).

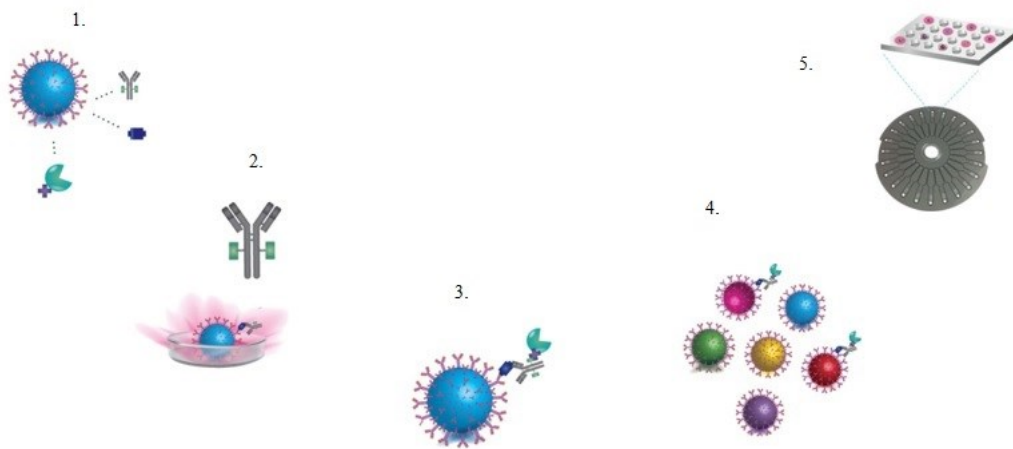
Slibných výsledků dosahovaly likvorové NfL také v predikci mozkové atrofie. Ať už v práci Arrambide et al., kde byly prokázány jako dobrý prediktor 5letého poklesu BPF ($p < 0,0001$) či práce výzkumné skupiny Hakansson et al., ve které byly tyto závěry podpořeny (Hakansson et al. 2018, Arrambide et al. 2016).

Jak již bylo uvedeno výše, doposud výrazným omezením ve využití neurofilament v praxi byla především potřeba jejich stanovení v mozkomíšním moku, tedy invazivní metodou bez možnosti pravidelné kontroly v čase. Běžně dostupná ELISA metoda, která je používána ke stanovení neurofilament v likvoru, není pro stanovení v séru, jež by bylo pro rutinní detekci nejvhodnější, dostatečně citlivá (Fialova et al. 2013). Detekční limit ELISA metody (LoD; NF-light kit, Uman Diagnostics) je 32 pg/ml, limit kvantifikace (LoQ) 81 pg/ml, avšak hladina NfL v séru u pacientů s RS se nejčastěji pohybuje právě v řádech několika málo desítek pg/ml, tedy také pod detekčním limitem této metody. Ke změně došlo v roce 2015, kdy ke stanovení NfL v séru (sNfL) u pacientů s HIV infekcí byla poprvé použita metoda Simoa (Single molecule array) (Gisslén et al. 2016) (Obrázek 3).

Jedná se o ultrasenzitivní imunochemickou metodu, která je založena na přidání paramagnetických částic s navázanou protilátkou (vážící se k námi požadovanému antigenu) k analyzovanému vzorku a poté přidání značící protilátky schopné fluorescence. Následně dojde k vytvoření imunokomplexu navázaného na paramagnetickou částici. Každá jednotlivá částice obsahuje jeden navázaný antigen. Po vložení vzorku do přístroje dojde k navázání částic pomocí speciálních Simoa disků, z nichž každý obsahuje více než 200 000 mikrojamek, přičemž každá jamka váže pouze jednu jedinou částici. Detekční limit této metody je kolem 1 pg/ml (LoD = 0,038 pg/ml, LoQ = 0,174 pg/ml). Metodiku poté Kuhle et al. aplikovali na séra pacientů s RS a výsledky porovnali s dalšími dvěma metodami – ELISA a elektrochemiluminiscencí (ECL). Korelace hladiny NfL v séru a likvoru (nezávisle na tom, zda byla hladina v likvoru stanovena metodou Simoa či ELISA) byla 0,88, nejvyšší ze všech použitých metod (Kuhle et al. 2016).

Nyní napříč obory probíhá ověřování počátečních hypotéz a validace metodiky, jež by umožnila zavedení tohoto markeru do běžné klinické praxe.

Obrázek 3. Princip metody Single molecule array (Simoa)



Podklad schématu převzat z <https://www.quanterix.com/simoa-bead-technology>.

1. Paramagnetická částice s navázanou protilátkou (váží se k námi požadovanému antigenu) 2. Přidání těchto částic k analyzovanému vzorku s následným přidáním značící protilátky schopné fluorescence. 3. Vytvoření imunokomplexu navázaného na paramagnetickou částici. 4. Každá jednotlivá částice obsahuje jeden navázaný antigen. 5. Vazba částic pomocí speciálních Simoa disků (každý disk > 200 000 mikrojamek, každá jamka váže pouze jednu jedinou částici). LoD = 0,038 pg/ml, LoQ = 0,174 pg/ml.

2. Cíle práce a hypotézy

Cíle a hypotézy jsou rozděleny do 2 částí podle jednotlivých zkoumaných markerů:

1. řeč jakožto marker klinický a 2. lehké řetězce neurofilament (NfL) jako marker paraklinický.

2.1. Řeč

Primárním cílem bylo vyhodnocení řečových parametrů u pacientů s RS a porovnání výsledků s hodnotami zdravé populace. Sekundárním cílem bylo porovnání řečových parametrů s ostatními klinickými (např. chůze, kognice, funkce horní končetiny) a paraklinickými markery (regionální a celková atrofie dle MR).

2.1.1. Hypotézy

1. Akustická analýza řeči je schopná odlišit zdravé kontroly od pacientů s RS.
2. Řečové abnormality jsou schopné odlišit pacienty s převahou pyramidového postižení od pacientů s mozečkovým postižením.
3. Řečové abnormality korelují s rezonančními parametry celkové a regionální atrofie (morfologický podklad spastické a ataktické dysartrie).

2.2. NfL

Hlavním cílem bylo objasnit význam sNfL a jejich pozici mezi ostatními klinickými či rezonančními parametry a zhodnocení sNfL jako markeru pro sledování aktivity nemoci a predikce průběhu onemocnění. Sekundárním cílem bylo zhodnocení korelace NfL s ostatními biochemickými parametry (likvorovými i sérovými).

2.2.1. Hypotézy

1. Hladina sNfL odpovídá klinické aktivitě nemoci.
2. Hladina sNfL odpovídá radiologické aktivitě nemoci.
3. sNfL jsou prediktorem klinické aktivity nemoci.
4. sNfL jsou prediktorem mozkové atrofie.
5. Hladina sNfL koreluje s tíží poruchy hematoencefalické bariéry.

3. Metodika

3.1. Řeč

Vyšetření řeči bylo provedeno mezi rokem 2016–2017 u 141 pacientů s diagnózou RS (6 pacientů s CIS, 107 pacientů s RR RS, 18 pacientů se SP RS a 10 pacientů s PP RS) (Polman et al. 2011). Výsledky byly porovnány se 70 zdravými kontrolami spárovanými dle věku a pohlaví. Pacienti absolvovali klinické vyšetření dle škály EDSS a MSFC (obsahující testy 25FWT, 9HPT, PASAT). K posouzení vztahu řečových abnormalit a kognice bylo u 122 pacientů doplněno zhodnocení procesní rychlosti pomocí SDMT (Friedova et al. 2019). Pacienti byli rozděleni do 3 skupin dle tíže disability v pyramidovém a mozečkovém funkčním podsystemu hodnotící škály EDSS: 1. bez přítomné disability (celkové EDSS <2, respektive v pyramidovém a cerebelárním podsystemu hodnota 0 či 1); 2. s převahou pyramidového postižení (skóre v pyramidovém podsystemu ≥ 2 a v mozečkovém podsystemu 0 či 1) 3. s pyramidovým a mozečkovým postižením (hodnota v obou podsystemech ≥ 2). Žádný z pacientů neměl mozečkové skóre ≥ 2 a zároveň v pyramidovém podsystemu hodnotu 0 či 1 (Rusz et al. 2017).

Řeč pacientů byla pod dohledem specializovaného logopeda nahrávána při třech specifických řečových testech, pomocí kterých bylo možno objektivizovat a blíže popsat motorické řečové abnormality (Duffy 2013). Tyto testy sloužily k posouzení fonace (test „dlouhé á“), orální diadochokineze (test „pa-ta-ka“), artikulace a prosodie (čtení krátkého textu). K podrobnému zhodnocení těchto parametrů byla použita metoda počítačové akustické analýzy, ve které bylo hodnoceno 10 unikátních řečových dimenzí (Rusz et al. 2011, Hlavnicka et al. 2017). Detailní popis jednotlivých řečových dimenzí je dostupný v příloženém článku (Rusz et al. 2017). Celkem u 123 pacientů s kompletním řečovým vyšetřením a klinickým zhodnocením dle EDSS byla provedena magnetická rezonance mozku a krční míchy (Skyra 3T, Siemens Healthcare). Byly provedeny sekvence 3D-MPRAGE, 3D FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery), 3D DIR (Double Inversion Recovery), DWI (Diffusion Weighted Imaging) a 3D T2 vážená sekvence s potlačením tuku k zobrazení míchy (Rusz et al. 2019).

Veškeré statistické analýzy byly provedeny v Matlab. Ke zhodnocení korelací byl použit Pearsonův korelační koeficient. K odhadu prevalence dysartrie u pacientů s RS byla použita metoda ROC křivky.

3.2. NfL

3.2.1. Pacienti

Do projektu zhodnocení hladin NfL a jejich významu u RS bylo vybráno 172 pacientů z originální kohorty SET (Study of Early Interferon beta-1a Treatment) (Uher et al. 2015, Kalincik et al. 2012). Studie SET byla investigátorem iniciovaná, multicentrická, klinická studie, do které byli pacienti zařazeni mezi roky 2005-2009. Jednalo se o pacienty po první demyelinizační atace dle tehdejších kritérií CIS, dle současných revidovaných McDonaldových kritérií z roku 2017 pacienty již s klinicky definitivní RS (Thompson et al. 2018). Vstupními kritérii byl věk mezi 18 a 55 lety, doba mezi vznikem prvních obtíží a přijetím do studie nesměla být delší než 4 měsíce, EDSS na baseline $\leq 3,5$, ≥ 2 T2 hyperintenzity na diagnostické MR a ≥ 2 OCB v mozkomíšním moku. Baseline MR byla provedena ≥ 30 dní po intravenózní terapii 3-5g methylprednisolonu a před zahájením terapie DMD. U všech pacientů byla následně zahájena terapie intramuskulárním interferonem beta-1a (Avonex; Biogen Idec).

K analýze byla využita data ze 4letého klinického a rezonančního sledování společně s daty ze stanovení hladiny NfL v sérových vzorcích, které byly pravidelně odebírány minimálně 1x ročně po dobu 36 měsíců.

3.2.2. Měření hladin NfL

K měření hladin NfL byly využity vzorky likvoru a séra, které byly uskladňovány v rámci zásad správného biobankingu a po celou dobu skladování zamrazeny v -80°C (Teunissen, Petzold, et al. 2009, Teunissen et al. 2013). Lumbální punkce byla provedena za standardizovaných podmínek s odběrem celkového množství 20 ml likvoru a 5 ml krve. Odběr mozkomíšního moku byl vždy proveden před zahájením kortikoterapie či DMD terapie.

Ke stanovení hladin NfL v mozkomíšním moku byly využity diagnostické likvory 139 pacientů. K longitudinálnímu zhodnocení sérových hladin NfL byly využity vzorky diagnostické, baselinové (M0; den zahájení terapie DMD) a dále vzorky z jednotlivých timepointů odpovídajících délce terapie DMD (M1, M12, M24 a M36). Přehled kompletního počtu vzorků viz Tabulka 2.

Tabulka 2. Přehled počtu analyzovaných vzorků

Timepoint	Počet vzorků
Diagnostický likvor	139
Diagnostické sérum	157
M0 sérum	64
M1 sérum	158
M12 sérum	156
M24 sérum	137
M36 sérum	129
Suma	940

Diagnostický likvor a sérum: odběry provedeny před terapií methylprednisolonem; M0 sérum: odběr proveden v den zahájení terapie DMD; M1, M12, M24, 36: počet měsíců od zahájení terapie DMD

Hladina NfL v likvoru byla měřena metodou ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) za použití komerčně dostupných kitů NF-light UmanDiagnostics v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1.LF UK a VFN v Praze. Detekční rozmezí kitů bylo 100 – 10 000 pg/ml s detekčním limitem 32 pg/ml. Všechna stanovení byla provedena pomocí analyzátoru Tecan Sunrise ELISA reader za použití Megallan softwaru (Tecan Group Ltd., Switzerland). Vzorky byly analyzovány duplicitně. Inter/intra-assay variační koeficient nepřekročil 10 %.

Sérové hladiny NfL byly měřeny pomocí platformy Simoa (Quanterix; blíže viz 1.3.2.1.) na univerzitním pracovišti v Basileji. Vzorky byly měřeny duplicitně. Inter-assay variační koeficient byl pod 10 % a průměrná hodnota intra-assay variačního koeficientu byla 6,4 % (Barro et al. 2018, Disanto et al. 2017). U obou metod byla měření provedena na kódovaných vzorcích bez znalosti rezonančních či klinických dat pracovníky laboratoře (Srpoval et al. 2020).

3.2.3. Stanovení dalších laboratorních parametrů

Za účelem posouzení vztahu mezi HEB, NfL a zánětlivými markery CNS byly v likvoru a krvi zhodnoceny hladiny albuminu, imunoglobulinu G (IgG) a imunoglobulinu M (IgM). Tyto parametry byly měřeny metodou imunonefelometrie (IMMAGE analyzátor; Beckman Coulter). Průtokovou cytometrií byly stanoveny počty jednotlivých buněčných subtypů v likvoru (při stanovení byly použity protilátky proti antigenům, CD 80, CD8019, CD4,

CCR5 a CXCR3; analyzátor FACSCanto; BD Sciences) a byl vypočten albuminový kvocient jakožto přímý marker integrity HEB. Imunofenotypizace byla provedena celkem u 72 pacientů (Uher, McComb, et al. 2020).

Za účelem posouzení významu NfL byla využita data ze stanovení parametrů lipidogramu a jejich vztah k hladinám NfL. Jednalo se o celkový cholesterol, HDL cholesterol (HDL-C), LDL cholesterol (LDL-C) a sérové apolipoproteiny (ApoA-I, ApoA-II, ApoB a ApoE). Tyto parametry byly k dispozici celkem od 133 pacientů a byly stanoveny z vzorků séra odebraných v rámci screenových/diagnostických odběrů, tedy před kortikoterapií či léčbou DMD. Celkový cholesterol a HDL-C byly stanoveny pomocí diagnostických kitů Sekisui Diagnostics (Lexington, MA) a hodnota LDL-C byla získána výpočtem pomocí Friedewaldovy rovnice (Friedewald, Levy, and Fredrickson 1972). Hladiny apolipoproteinů byly analyzovány metodou imunoturbidometrie za použití kitů Kamiya Biomedical (Thousand Oaks, CA) na automatickém chemickém analyzátoru ABX Penta 400 (Horiba Instruments, CA). Variační koeficient těchto stanovení byl <5 % (McComb et al. 2020). Z dalších laboratorních parametrů stanovených v periferní krvi byla zkoumána asociace mezi NfL a přítomností alely HLA DRB1*1501, hladinou protilátek proti viru Epstein-Barrové (EBV) a hladinou 25-hydroxyvitaminu D3 (Uher, McComb, et al. 2020).

Výše zmíněné parametry byly měřeny prospektivně v době odebrání vzorků krve a likvoru. Hladiny NfL byly měřeny retrospektivně ze zamrazených vzorků a před stanovením NfL nebyly použity k žádné jiné analýze.

3.2.4. Klinické vyšetření

U pacientů byla pravidelně v intervalu 3-6 měsíců hodnocena disabilita pomocí Kurtzkeho škály EDSS.

3.2.5. Magnetická rezonance

V této studii byla analyzována 4letá rezonanční data. MR mozku byla vždy provedena ve stejném protokolu a na stejném přístroji na Neurologické klinice 1.LF UK a VFN v Praze (Gyrosan 1,5T, Philips Medical Systems; Nizozemsko). Pacienti byli vyšetřeni v baselině (M0), v měsíci 12, 24, 36 a 48 (M12, M24, M36 a M48). Protokol obsahoval 2 základní sekvence: FLAIR a T1-WI/FFE 3D. V rámci baselinové MR pacienti absolvovali vyjma

základních sekvencí také postkontrastní T1-SE sekvenci 5 minut po podání kontrastní látky (0,1 mmol/kg Gd-DTPA). Přítomnost a počet gadolinium enhancujících lézí byly hodnoceny zkušeným neuroradiologem specializujícím se na problematiku roztroušené sklerózy. Baselinová MR byla provedena ≥ 30 dní po podání methylprednisolonu. Volumetrická semi-automatická analýza celkového mozkového objemu (WBV), brain parenchymal fraction (BPF), objemu corpus callosum (CCV), objemu T2 a T1 lézí (T1 a T2LV) a počet T2 lézí byla provedena pomocí softwaru ScanView (Uher et al. 2017). Objem šedé hmoty (GMV) a bílé hmoty (WMV) byl analyzován za použití softwaru SIENAX (<https://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/SIENA>). Hodnoty BPF, CCV a GMV byly normalizované na totální intrakraniální objem (ICV) (Srpova et al. 2020, Uher, Schaedelin, et al. 2020).

3.2.6. Statistická analýza

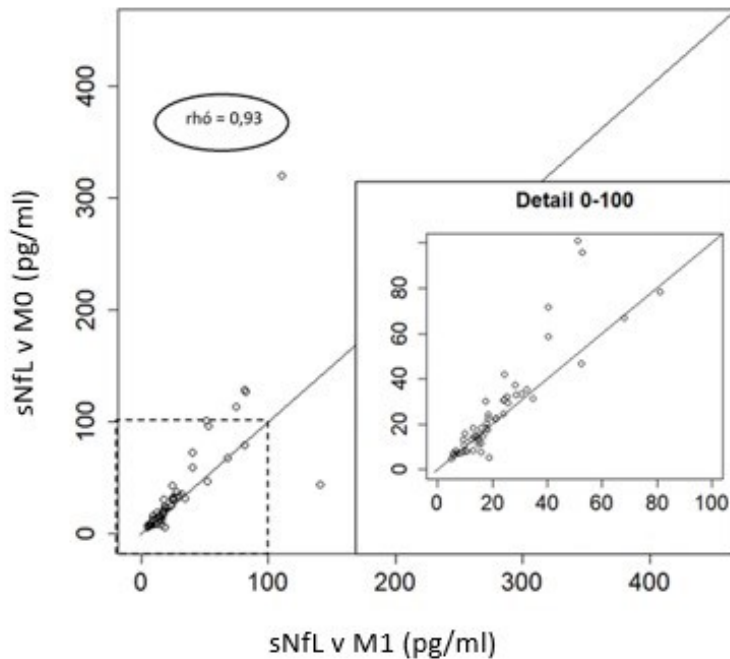
Veškeré statistické analýzy byly provedeny ve statistickém programu R (<http://www.R-project.org>) či SPSS (verze 19.0 a 22.0, IBM Inc., USA). Pro zpřesnění analýzy byly použity zlogaritmované hodnoty sNfL, likvorových parametrů (NfL, albumin, IgG, IgM, indexy IgG a IgM, Q_{A1b}) a T2LV.

Spearmanův korelační test byl použit k určení korelací mezi sNfL a hladinou NfL v likvoru, dále mezi jednotlivými sérovými hladinami ve všech timepointech a ostatními baselinovými parametry.

Longitudinální vztah mezi procentuální změnou NfL v M1 a M12, M24 a M36 (respektive změna mezi M1 a M12, M1 a M24, M1 a M36) a změnou rezonančních a klinických parametrů mezi baseline (M0) a M12, M24 a M36 (respektive změna mezi M0 a M12, M0 a M24, M0 a M36) byl testován pomocí lineárního „mixed effect“ modelu.

Využití hodnot NfL v M1 namísto baselinových hodnot bylo zapříčiněno nízkým počtem analyzovaných baselinových vzorků v porovnání s M1 (64 vs. 158) a jejich vysokou vzájemnou korelací (Spearman $\rho = 0,93$; $p < 0,001$) (Obrázek 4). Screeningové hodnoty nebyly použity pro jejich větší variabilitu a menší korelaci s M0 (Spearman $\rho = 0,71$; $p < 0,001$).

Obrázek 4. Korelace sNfL v M0 a M1



sNfL: sérové hladiny lehkých řetězců neurofilament; M0: měsíc 0/den zahájení terapie DMD/baseline; M1: měsíc 1 od zahájení terapie DMD

Byly vytvořeny univariátní modely pro jednotlivé proměnné, ve kterých relativní změna sNfL mezi M1 a jednotlivými timepointy byla závislá proměnná a změna ostatních parametrů mezi baseline a jednotlivými timepointy (čas, změna EDSS, kumulativní počet relapsů, absolutní změna T1LV a T2LV, kumulativní počet T2 lézí, procentuální změna WBV, GMV, CCV a počet GAD lézí v daném timepointu) byly považovány za vysvětlující proměnné. Pro každý model bylo vypočítáno Akaikovo informační kritérium (AIC).

Na základě výsledků univariátních modelů a stupně kolinearity mezi jednotlivými proměnnými byl vytvořen finální multivariátní model, který obsahoval tyto nezávislé proměnné: čas od baseline, změna EDSS od baseline, kumulativní počet relapsů od baseline, kumulativní počet T2 lézí od baseline, absolutní změna T1LV od baseline a procentuální změna WBV od baseline. Síla modelu byla zhodnocena pomocí AIC a signifikance jednotlivých proměnných byla posouzena pomocí t-testu.

K posouzení prediktivní schopnosti sNfL byla použita multivariátní lineární regrese adjustovaná na věk a pohlaví. Dále byli porovnání pacienti s „No Evidence of Disease

Activity“ (NEDA-3) po celou dobu sledování s pacienty s aktivitou nemoci – „Evidence of Disease Activity“ (EDA-3), kteří ztratili NEDA-3 status mezi jednotlivými timepointy.

K posouzení vztahu sNfL s likvorovými parametry, protilátkami proti antigenům viru Epstein-Barrové, hladinami 25-hydroxyvitaminu D3, přítomnosti pozitivní alely HLA DRB1*1501 a parametry lipidogramu byla použita lineárně regresní analýza. Pro posouzení souvislostí mezi sNfL a subtypy lymfocytů byla použita negativní binomiální regresní analýza.

Za účelem kontroly chyby 1. typu byla při mnohonásobném testování hypotéz použita Benjamini-Hochbergova metoda (B-H) se stanovenou hladinou významnosti $q=0,05$ (Benjamini and Hochberg 1995).

4. Výsledky

4.1. Řeč

Z celkového počtu 141 pacientů bylo 72 % žen. Průměrný věk byl 44 let (± 10 let, rozmezí 18-74 let) a průměrná doba trvání nemoci byla 14,7 let ($\pm 7,6$ let, rozmezí 2-37 let). Základní demografickou a klinickou charakteristiku zkoumané kohorty, včetně rozdělení na 3 podskupiny dle postižení v pyramidovém a mozečkovém podsystému, shrnuje Tabulka 3.

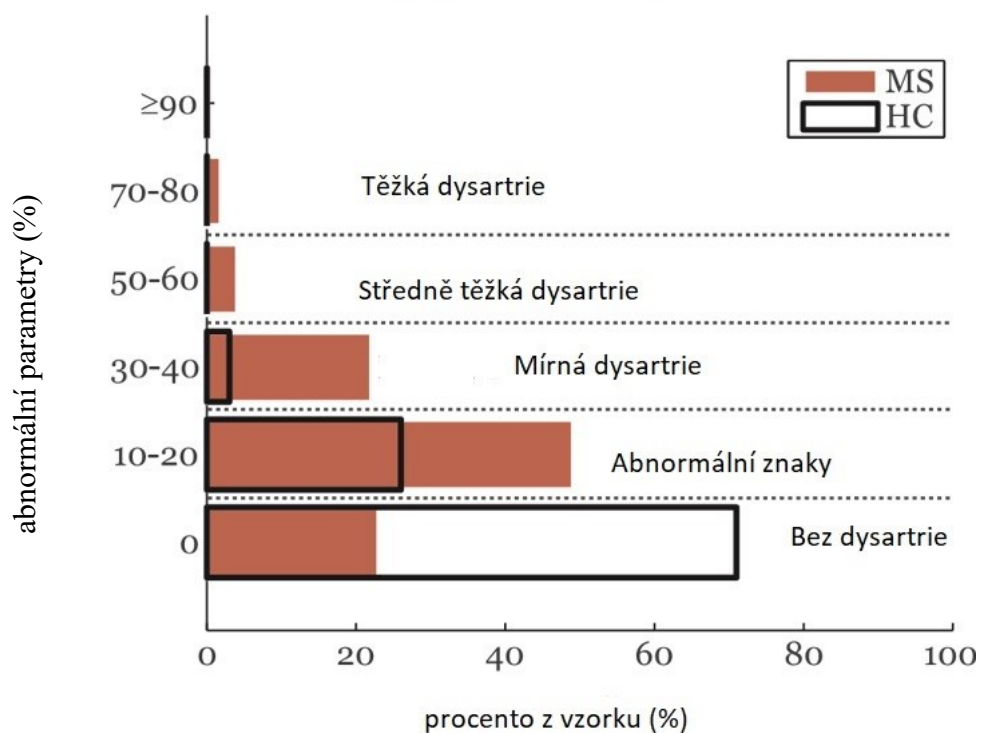
Tabulka 3. Základní demografická a klinická charakteristika kohorty

	RS (n = 141)	Bez disability (n = 28)	Pyramidové postižení (n = 38)	Pyramidové a cerebelární postižení (n = 75)
Průměrný věk (roky)	44 (± 11 ; 18-74)	35 (± 10 ; 18-54)	44 (± 9 ; 25-71)	47 (± 10 ; 28-74)
Ženy	72% (n=101)	75% (n=21)	79% (n=30)	68% (n=51)
Muži	28% (n=40)	25% (n=7)	21% (n=8)	32% (n=24)
Průměrné trvání nemoci (roky)	14,7 ($\pm 7,6$; 2-37)	9.6 ($\pm 6,1$; 2-25)	13.6 ($\pm 7,4$; 2-33)	17.2 ($\pm 7,3$; 5-37)
Průměrné EDSS	3,7 ($\pm 1,4$; 1-6,5)	1.7 ($\pm 0,3$; 1-2)	3.4 ($\pm 1,0$; 2-6)	4.7 ($\pm 0,9$; 2,5-6,5)
Průměrný 25FWT	5,6 ($\pm 2,0$; 3-6,6)	4.2 ($\pm 0,5$; 3-15,8)	5.5 ($\pm 2,1$; 3,9-15,4)	6.2 ($\pm 2,1$; 3,9-16,6)
Průměrný 9-HPT	25 (± 11 ; 15-114)	19 (± 2 ; 15-23)	22 (± 4 ; 15-34)	28 (± 14 ; 18-114)
Průměrný PASAT	44 (± 16 ; 0-60)	48 (± 15 ; 5-60)	50 (± 11 ; 11-60)	40 (± 18 ; 0-60)

RS: roztroušená skleróza; Bez disability: skupina pacientů s EDSS<2 (respektive v pyramidovém a cerebelárním podsystému hodnota 0 či 1); S převahou pyramidového postižení: skóre v pyramidovém podsystému ≥ 2 a v mozečkovém podsystému 0 či 1; S pyramidovým a cerebelárním postižením: hodnota v obou podsystémech ≥ 2 ; 25FWT: 25-Foot Walk Test; EDSS: Expanded Disability Status Scale; 9HPT: 9 Hole Peg Test; PASAT: Paced Auditory Serial Addition Test

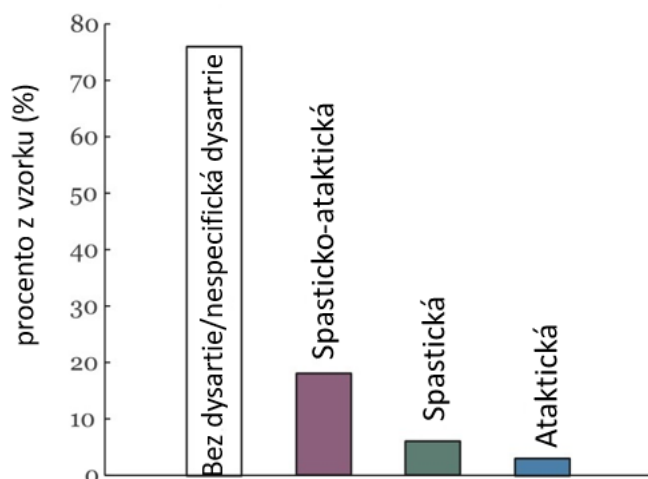
Celkem u 28 % pacientů a pouze 3 % kontrolních jedinců byly nalezeny deficity ve více než 2 z 10 zkoumaných řečových dimenzí. Převažující tíže dysartrie u pacientů s RS byla mírná (Obrázek 5). Nejčastějším typem dysartrie byla spasticko-ataktická dysartrie (18 %), dále u 6 % byla přítomna spastická dysartrie, u 4 % ataktická a u jednoho pacienta byl shledán nespecifický typ dysartrie (Obrázek 6).

Obrázek 5. Přehled prevalence a tíže dysartrie u pacientů RS a zdravých kontrol



MS: pacienti s RS; HC: zdravé kontroly

Obrázek 6. Typ dysartrie u pacientů s RS



Jednotlivé klinické skupiny (1. bez přítomné disability 2. s převahou pyramidového postižení 3. s kombinovaným pyramidovým a mozečkovým postižením) a zdravé kontroly se lišily v několika řečových parametrech. Skupina s kombinovaným pyramidovým/mozečkovým postižením se lišila ve všech řečových dimenzích ve srovnání se zdravými kontrolami. Mezi skupinou s pyramidovým a kombinovaným pyramidovým/mozečkovým postižením byl prokázán signifikantní rozdíl ve zpomaleném tempu řeči ($p < 0,01$), nepravidelné orální diadochokinezi ($p < 0,05$) a nadměrné variaci hlasitosti ($p < 0,05$). Mezi skupinou bez přítomné disability a zdravými kontrolami byl detekován signifikantní rozdíl v parametrech oslabení artikulace a monotónnosti řeči ($p < 0,001$). Kombinací těchto dvou řečových dimenzí bylo možné identifikovat pacienty bez přítomné disability, tedy tzv. asymptomatické pacienty, od zdravých kontrol s přesností $77,5 \pm 7,9 \%$ (senzitivita $77,6 \pm 7,9 \%$; specificita $86,3 \pm 15,0 \%$).

V porovnání řečových a neurologických parametrů jsme identifikovali nejsilnější korelaci mezi 9HPT a nepravidelnou orální diadochokinezí ($r = 0,65$; $p < 0,001$). Zpomalení tempa řeči korelovalo se všemi klinickými parametry (EDSS, 25FWT, PASAT3, 9HPT: $r = 0,41-0,54$; $p < 0,001$) (Tabulka 4) (Rusz et al. 2017).

Tabulka 4. Korelace řečových a klinických parametrů

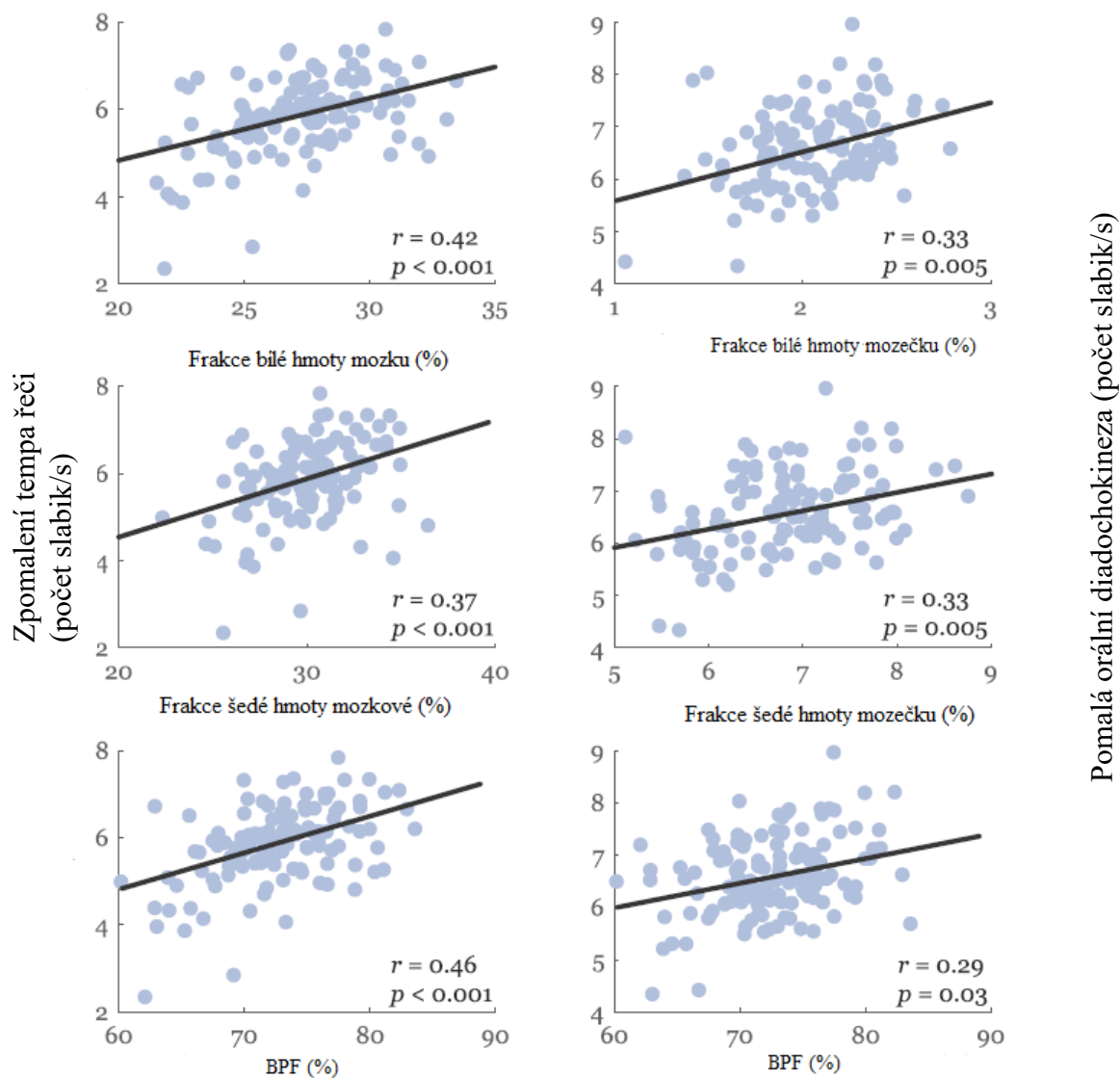
Řečové parametry	EDSS	25FWT	9HPT	PASAT3
Nepravidelná hlasová poloha	0,30*	0,18	0,43***	-0,29*
Frekvenční nestabilita	0,28*	0,08	0,17	-0,10
Zvýšený šum v hlase	-0,22**	-0,08	-0,15	0,12
Nepravidelná orální diadochokineza	0,21	0,19	0,65***	-0,17
Nepřesná artikulace souhlásek	0,31**	0,21	0,31*	-0,11
Slábnutí artikulace	0,23	0,06	0,30	-0,07
Zpomalení tempa řeči	-0,50***	-0,41***	-0,54***	0,42***
Nadměrná variace hlasitosti	0,34**	0,38***	0,38***	-0,27
Monotónní melodie hlasu	-0,05	-0,18	-0,11	-0,18

Pearsonovo r : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; 25FWT: 25-Foot Walk Test; EDSS: Expanded Disability Status Scale; 9HPT: 9 Hole Peg Test; PASAT-3: Paced Auditory Serial Addition Test

V doplněné analýze stanovených hodnot SDMT u 122 pacientů byla prokázána silná korelace mezi zpomalením tempa řeči a SDMT ($r=0,58$; $p < 0,001$) (Friedova et al. 2019).

V korelační analýze řečových a rezonančních parametrů jsme prokázali signifikantní korelaci mezi pomalou orální diadochokinezí a frakcí bílé i šedé hmoty mozečku ($r=0,33$; $p < 0,005$). Dále zpomalení tempa řeči signifikantně souviselo s bílou i šedou frakcí mozku ($r=0,37-0,42$; $p < 0,001$) a také s BPF ($r=0,46$; $p < 0,001$) (Rusz et al. 2019) (Obrázek 7).

Obrázek 7. Zobrazení signifikantních korelací mezi řečovými a rezonančními parametry



BPF: Brain Parenchymal Fraction (%)

4.2.NfL

4.2.1. Základní demografie, asociace mezi sNfL a baselinovými parametry

Přehled základních demografických, klinických a rezonančních charakteristik kohorty na baseline je uveden v Tabulce 5. Poměr žen a mužů ve skupině byl 2:1, průměrný věk 29 let, průměrná doba mezi začátkem nemoci a zahájením léčby byla 82 dní.

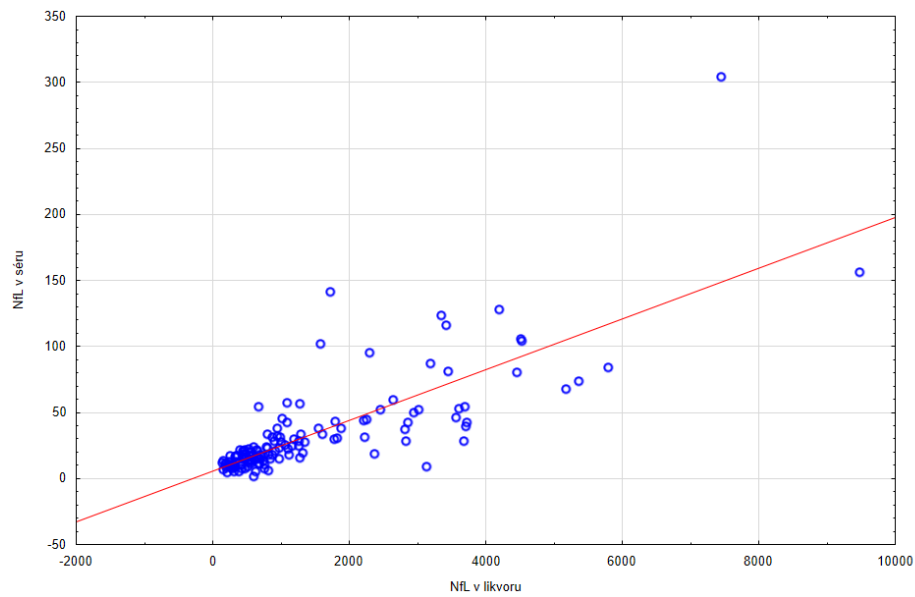
Tabulka 5. Přehled základních demografických, klinických a rezonančních charakteristik

Proměnná	Median (IQR)
Věk v době počátku nemoci (roky)	28,00 (23,50–33,50)
Pohlaví (ženy/muži)	115/57
Čas mezi začátkem nemoci a baseline (dny)	79,50 (64,00–99,75)
EDSS	1,50 (1,5–2,0)
Celkový objem mozku (cm ³)	1184,00 (1117,40–1249,30)
BPF (%)	87,09 (85,83–88,10)
CCF (%)	0,32 (0,29 – 0,35)
GMF (%)	44,60 (43,38–46,27)
Objem T2 lézí (cm ³)	0,63 (0,21–2,01)
Objem T1 lézí (cm ³)	0,48 (0,28–0,92)
Počet T2 lézí	6,00 (3,00– 5,00)
Přítomnost GAD lézí na baseline	45 (27%)

IQR: interkvartilové rozmezí; EDSS: Expanded Disability Status Scale; BPF: Brain Parenchymal Fraction; CCF: Corpus Callosum Fraction; GMF: Grey Matter Fraction; GAD: gadolinium enhancing léze

Byla prokázána silná korelace mezi sNfL a hladinami NfL v likvoru odebranými v době stanovení diagnózy ($\rho=0,81$; $p<0,001$) (Srpoval et al. 2019) (Obrázek 5). Žádný z volumetrických rezonančních parametrů (BPF, GMF a CCF) signifikantně nekoreloval s hladinou sNfL v měsíci 1 (M1) ($\rho=0,08$, $0,02$ a $-0,14$; $p=0,338$, $0,793$ a $0,083$). Nejsilnější asociace s sNfL v M1 byla nalezena s objemem T2 lézí ($\rho=0,46$; $p<0,001$). Z klinických parametrů byla prokázána slabá korelace s EDSS ($\rho=0,21$; $p<0,01$). Souhrn baselinových korelací je uveden v Tabulce 6 (Srpoval et al. 2020).

Obrázek 8. Korelace mezi NfL v likvoru a séru



Zobrazené hodnoty v pg/ml. Spearmanovo $\rho=0,81$. Korelační analýza byla provedena na netransformovaných datech. NfL: lehké řetězce neurofilament

Tabulka 6. Přehled základních korelací mezi baselinovými klinickými a rezonančními parametry s hladinou NfL v měsíci 1 (M1)

Proměnná	ρ	p hodnota
Věk v době začátku nemoci (roky)	-0,09	0,281
Čas mezi začátkem nemoci a baseline (dny)	-0,09	0,27
EDSS	0,21	0,01
Objem T2 lézí (cm ³)	0,46	<0,001
Objem T1 lézí (cm ³)	0,36	<0,001
Počet T2 lézí	0,23	0,006
Počet GAD lézí	0,35	<0,001
GMF (%)	0,02	0,793
CCF (%)	-0,14	0,083
BPF (%)	0,08	0,338

ρ : Spearmanovo ρ ; EDSS: Expanded Disability Status Scale; GAD: gadolinium; GMF: Grey Matter Fraction; CCF: Corpus Callosum Fraction; BPF: Brain Parenchymal Fraction

4.2.2. Hladiny sNfL v průběhu 3letého sledování

Hodnoty hladin sNfL v jednotlivých timepointech jsou zobrazeny v Tabulce 7. Nejvyšší stanovená hladina sNfL byla na baseline (median 22,68 pg/ml; IQR 12,62-39,89 pg/ml) a nejnižší v M36 (median 12,24 pg/ml; IQR 8,96-16,49 pg/ml).

Tabulka 7. Hodnoty sNfL v jednotlivých timepointech v průběhu 3letého sledování

	N	Průměr	Median	Min	Max	IQR
sNfL screen	156	38,66	20,71	1,39	416,21	13,84 - 42,30
sNfL M0	64	43,99	22,68	4,97	475,78	12,62 - 39,89
sNfL M1	157	32,23	17,70	0,44	268,94	10,99 - 31,05
sNfL M12	155	19,00	13,86	1,69	147,57	9,51 - 21,29
sNfL M24	135	17,46	12,48	0,54	171,73	8,61 - 18,00
sNfL M36	126	15,17	12,24	3,11	137,26	8,96 - 16,49

Hodnoty sNfL jsou uvedeny v pg/ml.

N: počet dostupných měření; Min: minimum; Max: Maximum; IQR: interkvartilové rozmezí; sNfL: sérové hladiny lehkých řetězců neurofilament; screen: diagnostický odběr proveden v rámci lumbální punkce; M0, M1, M12, M24, M36: představuje počet měsíců od zahájení terapie DMD

V korelační analýze byla prokázána silná asociace mezi veškerými časnými timepointy (screen, M0 a M1). Nejsilnější vztah byl pozorován mezi baselinovými hodnotami (M0) a hladinou sNfL v M1 ($\rho=0,93$; $p<0,001$). Grafické zobrazení vztahu mezi M0 a M1 viz Obrázek 4. Přehled veškerých korelací mezi jednotlivými timepointy zobrazuje Tabulka 8. I přes nízkou asociaci mezi časnými a pozdějšími timepointy (M24, M36) na skupinové úrovni byl prokázán lineární pokles v průběhu sledování (Obrázek 9) (Srpova et al. 2020).

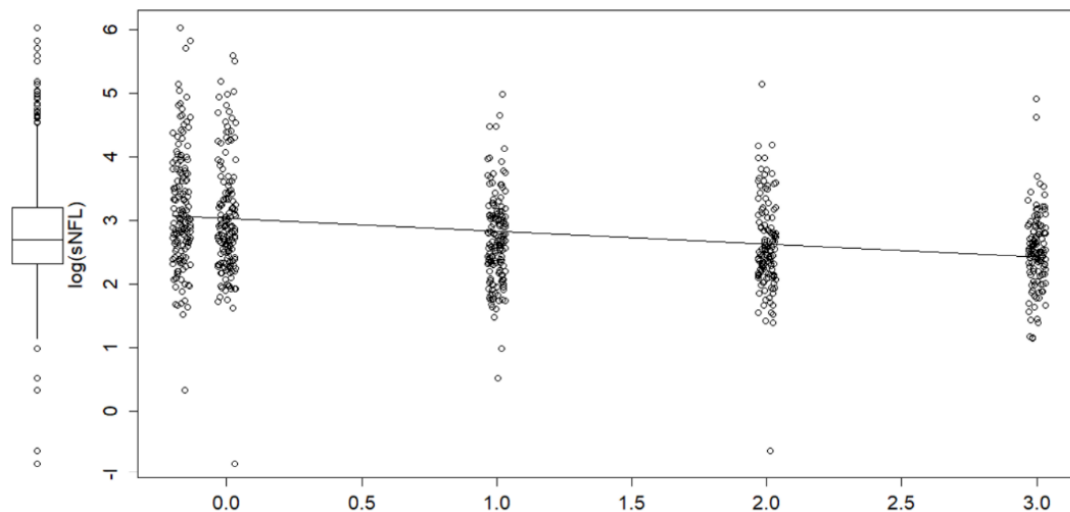
Tabulka 8. Výsledky korelační analýzy mezi jednotlivými timepointy

	sNfL screen	sNfL M0	sNfL M1	sNfL M12	sNfL M24	sNfL M36
sNfL screen	1,00	0,71***	0,79***	0,47***	0,41***	0,23*
sNfL M0	0,71***	1,00	0,93***	0,39**	0,21	0,10
sNfL M1	0,79***	0,93***	1,00	0,41***	0,31***	0,18
sNfL M12	0,47***	0,39**	0,41***	1,00	0,58***	0,58***
sNfL M24	0,41***	0,21	0,31***	0,58***	1,00	0,68***
sNfL M36	0,23*	0,10	0,18	0,58***	0,68***	1,00

*** Spearmanova korelace s hladinou významnosti $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ a * $p < 0.05$.

sNfL: sérové hladiny lehkých řetězců neurofilament; screen: diagnostický odběr proveden v rámci lumbální punkce; M0, M1, M12, M24, M36: představuje počet měsíců od zahájení terapie DMD

Obrázek 9. Zobrazení lineárního poklesu hladin sNfL v průběhu 3letého sledování



Na ose X zobrazen čas v letech.

Znázorněná přímka zobrazuje lineárně regresní přímku.

Log (sNfL): zlogaritmované sérové hladiny lehkých řetězců neurofilament.

4.2.3. Vztah mezi vývojem sNfL a ostatními parametry (klinickými a rezonančními) v průběhu 3letého sledování

Byla posuzována procentuální (relativní) změna sNfL (mezi M1 a ostatními timepointy) ve vztahu k absolutním či relativním (s ohledem na vlastnosti daného parametru) změnám klinických či rezonančních parametrů (změna mezi baseline a ostatními timepointy).

V univariátních modelech byla nejsilnější asociace prokázána mezi změnou sNfL a absolutní změnou T2LV ($p < 0,001$), absolutní změnou T1LV ($p < 0,001$), zvýšením počtu T2 lézí ($p < 0,001$) a počtem GAD lézí v jednotlivých timepointech ($p < 0,001$). Z klinických parametrů jediným, i když pouze slabě signifikantním, byl kumulativní počet relapsů ($p = 0,036$) (Tabulka 9).

Tabulka 9. Univariátní „mixed-effects“ modely popisující longitudinální vztah mezi procentuální změnou sNfL a změnou (absolutní či relativní) klinických a rezonančních parametrů

Nezávislá proměnná	Regresní koeficient	AIC	p hodnota
Čas od baseline	-0,044	612	0,094
EDSS absolutní změna	-0,03	609	0,454
Kumulativní počet relapsů	0,058	606	0,036
T2LV absolutní změna	0,104	549	<0,001
T1LV absolutní změna	0,256	557	<0,001
Kumulativní počet T2 lézí	0,062	548	<0,001
Počet GAD lézí	0,07	578	<0,001
WBV procentuální změna	4,273	603	0,148
GMV procentuální změna	1,314	603	0,183
CCV procentuální změna	0,654	605	0,557

Model zahrnoval procentuální změnu hladin sNfL mezi M1 a M12, M1 a M24 a M1 a M36 a změny nezávislých klinických a rezonančních parametrů mezi M0 a M12, M0 a M24 a M0 a M36.

Regresní koeficient byl nestandardizovaný.

AIC modelu bylo 504,5.

AIC: Akaikovo informační kritérium; EDSS: Expanded Disability Status Scale; T2LV: objem T2 lézí; T1LV: objem T1 lézí; GAD: gadolinium; WBV: Whole Brain Volume; GMF: Grey Matter Volume; CCV: Corpus Callosum Volume

Na základě výsledků univariátních modelů byl sestaven nejsilnější multivariátní model vysvětlující procentuální změnu sNfL, který obsahoval tyto proměnné: absolutní změnu T1LV, změnu v počtu T2 lézí a čas od baseline (Tabulka 10) (Srpova et al. 2020).

Tabulka 10. Multivariátní „mixed-effects“ model popisující longitudinální vztah mezi procentuální změnou sNfL a změnou (absolutní či relativní) klinických či rezonančních parametrů

Nezávislá proměnná	Regresní koeficient	p hodnota
Intercept	1,701	<0,001
Čas od baseline	-0,083	0,003
EDSS absolutní změna	-0,046	0,290
Kumulativní počet relapsů	0,046	0,179
T1LV absolutní změna	0,241	<0,001
Kumulativní počet T2 lézí	0,051	<0,001
WBV procentuální změna	5,231	0,094

Model zahrnoval procentuální změnu hladin sNfL mezi M1 a M12, M1 a M24 a M1 a M36 a změny nezávislých klinických a rezonančních parametrů mezi M0 a M12, M0 a M24 a M0 a M36.

Regresní koeficient byl nestandardizovaný.

Hodnota AIC modelu byla 504,5.

EDSS: Expanded Disability Status Scale; T1LV: objem T1 lézí; WBV: Whole Brain Volume

4.2.4. sNfL jako prediktor

V základní „cross-section“ analýze byl prokázán silný vztah mezi hladinou sNfL v M1 a rezonančními parametry v M48 (či jejich absolutní nebo relativní změnou mezi baseline a M48) (Tabulka 11). Mezi nejsilnější korelace patřila procentuální změna corpus callosum ($\rho=0,49$; $p<0,001$), šedé hmoty ($\rho=0,32$; $p<0,001$) a celkového objemu mozku ($\rho=0,34$; $p<0,001$). Z parametrů v M48 se jednalo o BPF ($\rho=0,33$; $p<0,001$) a objem T2 lézí ($\rho=0,40$; $p<0,001$). Z klinických parametrů byly prokázány korelace s EDSS v M48 ($\rho=0,27$; $p=0,001$) a kumulativním počtem relapsů ($\rho=0,20$; $p=0,015$).

Pomocí multivariátní lineárně regresní analýzy byl porovnán prediktivní potenciál sNfL z M1 a baselinové lezionální patologie v predikci budoucí mozkové atrofie. sNfL byly

v této analýze lepším prediktorem ve srovnání s objemem T1 a T2 lézí, počtem T2 lézí či počtem gadolinium enhancujících lézí (Tabulka 12) (Srpoval et al. 2020).

Tabulka 11. Korelace mezi sNfL v M1 a klinickými a rezonančními parametry (či jejich změnou oproti baseline) v M48

Proměnná	Rhó	p hodnota
EDSS absolutní změna	0,06	0,488
EDSS M48	0,27	0,001
Kumulativní počet relapse	0,20	0,015
CCV%	0,49	<0,001
GMV%	0,32	<0,001
WBV%	0,34	<0,001
BPF M48 (%)	0,33	<0,001
T2LV absolutní změna (cm ³)	0,02	0,839
T2LV M48 (cm ³)	0,40	<0,001
T1LV absolutní změna (cm ³)	0,04	0,607
T1LV M48 (cm ³)	0,24	0,003
Počet T2 lézí absolutní změna	0,12	0,250
Počet T2 lézí M48	0,25	0,009

Byly použity zlogaritmované hodnoty sNfL.

sNfL v M1: sérové hladiny lehkých řetězců neurofilament v měsíci 1 od zahájení terapie DMD; rhó: Spearmanovo rhó; EDSS: Expanded Disability Status Scale; EDSS M48: hodnota EDSS v měsíci 48; CCV%: procentuální změna objemu corpus callosum mezi baseline a měsícem 48; GMV%: procentuální změna objemu šedé hmoty mezi baseline a měsícem 48; WBV%: procentuální změna objemu mozku mezi baseline a měsícem 48; BPF M48: hodnota brain parenchymal fraction v měsíci 48; T2LV a T1LV absolutní změna/M48: změna objemu T1 a T2 lézí mezi baseline a měsícem 48/ hodnota v měsíci 48

Tabulka 12. Porovnání sNfL a lezionální patologie v predikci budoucí mozkové atrofie

Proměnná	Baselinové prediktory	Regresní koeficient	p hodnota
WBV%	sNfL v M1	0,005	0,001
	T2 lesion volume	0,001	0,106
CCV%	sNfL v M1	0,031	<0,001
	T2 lesion volume	0,004	0,016
GMV%	sNfL v M1	0,014	0,001
	T2 lesion volume	<0,001	0,816
WBV%	sNfL v M1	0,005	<0,001
	T1 lesion volume	0,002	0,163
CCV%	sNfL v M1	0,033	<0,001
	T1 lesion volume	0,010	0,038
GMV%	sNfL v M1	0,013	0,001
	T1 lesion volume	0,002	0,597
WBV%	sNfL v M1	0,004	0,003
	GAD lesion number	0,002	0,023
CCV%	sNfL v M1	0,023	<0,001
	GAD lesion number	0,020	<0,001
GMV%	sNfL v M1	0,010	0,008
	GAD lesion number	0,004	0,061
WBV%	sNfL v M1	0,004	0,002
	T2 lesion number	<0,001	0,004
CCV%	sNfL v M1	0,030	<0,001
	T2 lesion number	0,001	0,002
GMV%	sNfL v M1	0,011	0,004
	T2 lesion number	<0,001	0,069

Byla použita multivariátní lineární regrese. Modely byly adjustovány na věk a pohlaví.

Hodnoty sNfL byly logaritmičsky transformované.

Objemy T1 lézí (cm³), T2 lézí (cm³) a počet T2 lézí byly hodnoceny na baseline.

sNfL v M1: sérové hladiny lehkých řetězců neurofilament v měsíci 1 od zahájení terapie DMD;

WB%: procentuální změna objemu mozku mezi baseline a měsícem 48; CCV%: procentuální změna objemu corpus callosum mezi baseline a měsícem 48; GMV%: procentuální změna objemu šedé hmoty mezi baseline a měsícem 48; GAD: gadolinium

4.2.5. sNfL a lipidogram

U 133 pacientů (63 % žen; průměrný věk 29,9 let ± 8,0 let) z původní kohorty byly dostupné kompletní výsledky lipidogramu a hodnoty stanovení sNfL. Z toho u 103 pacientů byly k dispozici také hodnoty NfL z likvoru.

Byl prokázán signifikantní vztah (negativní závislost) mezi oběma hladinami NfL (jak v likvoru, tak v séru) a sérovou hladinou ApoA-II ($r_p = -0,28$, $p = 0,005$; $r_p = -0,32$, $p < 0,001$). Dále byla identifikována asociace mezi sNfL a HDL ($r_p = -0,23$; $p = 0,010$) a mezi NfL v likvoru a ApoA-I ($r_p = -0,26$; $p = 0,009$). Podrobný přehled výsledků je uveden v Tabulce 13.

Tabulka 13. Vztah likvorových a sérových hladin NfL s parametry lipidogramu

Nezávislá proměnná	NfL v likvoru		NfL v séru	
	r_p	P	r_p	P
Celkový cholesterol	-0,19	0,069	-0,16	0,074
HDL cholesterol	-0,14	0,18	-0,23	0,010*
LDL cholesterol	-0,16	0,10	-0,092	0,30
Apolipoprotein A-I	-0,26	0,009*	-0,19	0,028
Apolipoprotein A-II	-0,28	0,005*	-0,32	<0,001*
Apolipoprotein B	-0,17	0,098	-0,11	0,23
Apolipoprotein E	-0,10	0,32	-0,063	0,48

Signifikantní proměnné po B-H korekci s hladinou významnosti $q = 0,05$.

Byla použita lineární regrese. Model byl adjustován na věk, pohlaví a body mass index. V tabulce jsou uvedeny hodnoty parciálních koeficientů (r_p).

Hladiny NfL (jak v likvoru, tak v séru) byly použity ve zlogaritmované formě.

NfL: lehké řetězce neurofilament; HDL: High Density Lipoprotein; LDL: Low Density Lipoprotein

I po „adjustaci“ modelu dle počtu GAD lézí a T2LV (k již původnímu věku, pohlaví a body mass indexu) zůstala asociace mezi hladinami NfL (jak v séru, tak v likvoru) s ApoA-II signifikantní (Tabulka 14) (McComb et al. 2020).

Tabulka 14. Vztah likvorových a sérových hladin NfL s parametry lipidogramu po adjustaci na věk, pohlaví, body mass index, počet GAD lézí a T2LV

Nezávislá proměnná	NfL v likvoru		NfL v séru	
	r_p	P	r_p	P
HDL cholesterol	-0,086	0,40	-0,17	0,055
Apolipoprotein A-I	-0,25	0,014*	-0,18	0,045
Apolipoprotein A-II	-0,25	0,015*	-0,28	0,001*

Signifikantní proměnné po B-H korekci s hladinou významnosti $q=0.05$.

Byla použita lineární regrese. Model byl adjustován na věk, pohlaví, body mass index, počet GAD lézí a T2LV. V tabulce jsou uvedeny hodnoty parciálních koeficientů (r_p).

Hladiny NfL (jak v likvoru, tak v séru) byly použity ve zlogaritmované formě (\log_{10}).

NfL: lehké řetězce neurofilament; HDL: High Density Lipoprotein; LDL

4.2.6. sNfL a ostatní laboratorní parametry

Pomocí lineární regresní analýzy byla nalezena silná asociace mezi sérovými i likvorovými hladinami NfL a albuminovým kvocientem ($r_p=0,32$, $p<0,001$; $r_p=0,35$, $p<0,001$), likvorovým albuminem ($r_p=0,31$, $p<0,001$; $r_p=0,40$, $p<0,001$) a IgM kvocientem ($r_p=0,22$, $p=0,010$; $r_p=0,26$, $p=0,0092$). Dále byla nalezena asociace mezi NfL v likvoru a IgG kvocientem ($r_p=0,28$, $p<0,001$).

Mezi NfL a subpopulací lymfocytů v likvoru byla nalezena asociace pouze mezi sNfL a buňkami CD80+ ($\chi^2=6,3$; $p=0,012$) a CD80+/CD19+ ($\chi^2=5,92$; $p=0,015$). Podrobný přehled výsledků regresní analýzy je zobrazen v Tabulce 15.

Tabulka 15. Vztah mezi NfL (v likvoru a séru) a dalšími likvorovými parametry, buněčnými subtypy a stavem hematoencefalické bariéry

Likvorové parametry	NfL v séru		NfL v likvoru	
	r_p	P	r_p	P
Albumin	0,31	<0,001*	0,40	<0,001*
Albuminový kvocient	0,32	<0,001*	0,35	<0,001*
IgG kvocient	0,19	0,023	0,28	<0,001*
IgG index	-0,4	0,78	-0,059	0,55
IgM kvocient	0,22	0,010*	0,26	0,0092*
IgM index	0,083	0,345	0,10	0,31
Buněčné subtypy	χ^2	P	χ^2	P
CD80+	6,3	0,012*	1,00	0,32
CD4+	0,010	0,92	0,0024	0,96
CCR5+	0,054	0,82	0,86	0,35
CXCR3+	0,074	0,79	0,18	0,67
CD80+/CD19+	5,92	0,015*	0,20	0,66

Signifikantní proměnné po B-H korekci s hladinou významnosti $p < 0.05$.

K analýze likvorových parametrů byla použita lineární regrese. Model byl adjustován na pohlaví a věk. V tabulce jsou uvedeny hodnoty parciálních koeficientů (r_p).

K analýze buněčných subtypů byla použita binominální regrese. V tabulce jsou uvedeny hodnoty Waldova chí-kvadrátu (χ^2).

Hladiny NfL (jak v likvoru, tak v séru) a dále IgG index, IgM index a albuminový kvocient byly použity ve zlogaritmované formě (\log_{10}).

Z regresní analýzy zahrnující ostatní zkoumané laboratorní parametry (pozitivní alela HLA DRB1*1501, hladiny protilátek anti-VCA IgG a anti-EBNA-1 IgG a hladina 25-hydroxyvitaminu D3) byl nalezen vztah pouze mezi protilátkami proti viru Epstein-Barrové, resp. asociace mezi sNfL a IgG protilátkami proti virovému kapsidovému antigenu ($r_p=0,25$; $p=0,0026$) (Tabulka 16) (Uher, McComb, et al. 2020).

Tabulka 16. Přehled asociací mezi NfL (v likvoru a séru) a ostatními laboratorními parametry asociovanými s dg. RS

Laboratorní parametry	NfL v séru		NfL v likvoru	
	r_p	P	r_p	p
<i>HLA DRB1</i> *1501 positive	0,17	0,052	0,13	0,18
Anti-VCA IgG hladiny	0,25	0,0026*	0,23	0,023
Anti-VCA IgG kvartily	0,27	0,0013*	0,26	0,0092
Anti-EBNA-1 IgG hladiny	0,083	0.34	0,13	0,20
25-hydroxyvitamin D3	-0.069	0.44	-0,031	0,76

Signifikantní proměnné po B-H korekci s hladinou významnosti $p < 0.05$.

Byla použita lineární regrese. Model byl adjustován na pohlaví a věk. V tabulce jsou uvedeny hodnoty parciálních koeficientů (r_p).

Hladiny protilátek Anti-VCA IgG, Anti-EBNA-1 IgG a 25-hydroxyvitaminu D3 byly použity ve zlogaritmované formě (\log_{10}).

NfL: lehké řetězce neurofilament; *HLA DRB1**1501: Human Leukocyte Antigen DRB1 *1501; VCA: virový kapsidový antigen viru Epstein-Barrové; EBNA-1: nukleární antigen-1 viru Epstein-Barrové

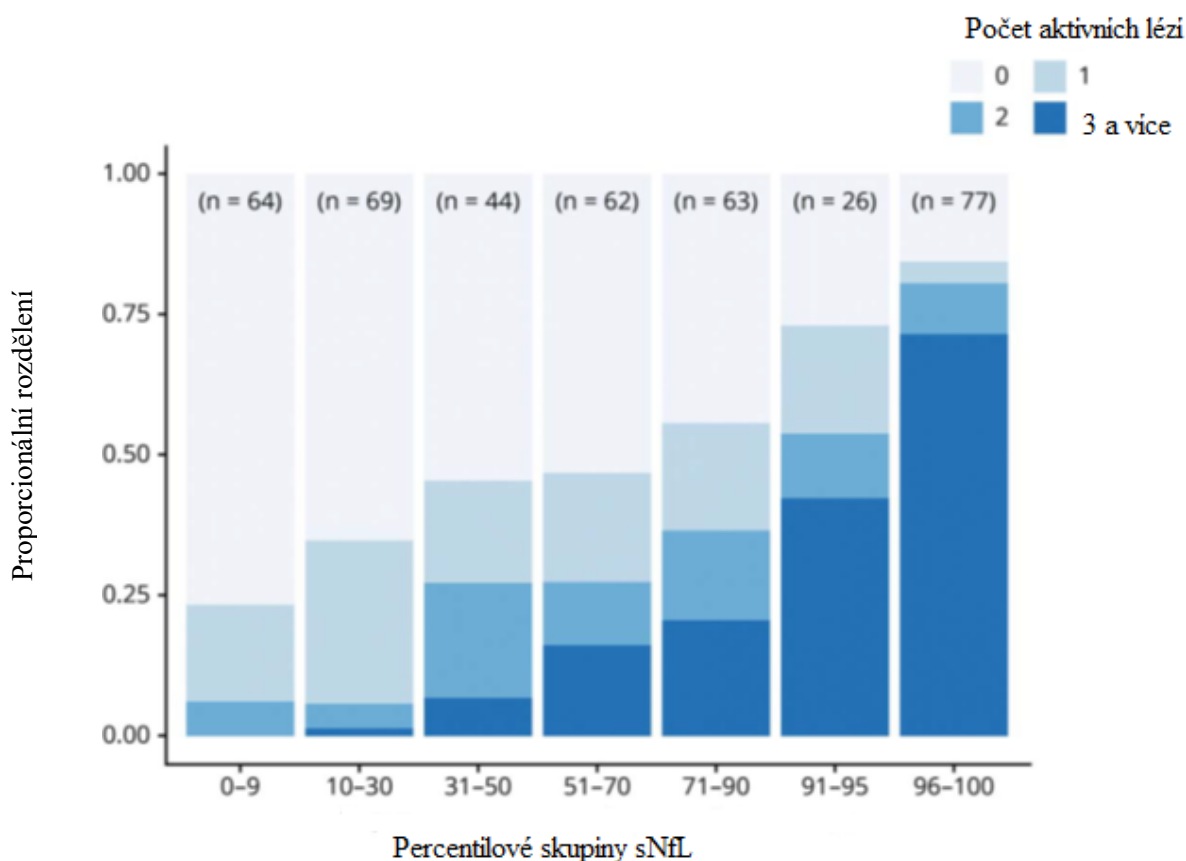
4.2.7. sNfL jako marker radiologické aktivity nemoci

K posouzení schopnosti monitorace radiologické aktivity pomocí sNfL byla využita podskupina 163 pacientů z originální kohorty, kteří měli stanovené hladiny sNfL a minimálně jednu kontrolní MR mozku v období mezi baseline a měsícem 36 na terapii DMD.

Byla prokázána asociace mezi větším počtem aktivních lézí na MR (nová léze, zvětšená léze či GAD léze) a hladinou sNfL (Obrázek 10). Vzorky s hladinou sNfL >90. percentil byly s 90% specificitou schopné identifikovat aktivitu na MR v předchozím roce. U 81,6 % pacientů, kteří měli hladiny sNfL \geq 90. percentilu (OR 3,4; 95 % CI=1,8-6,4), byla přítomna radiologická aktivita na MR (alespoň 1 aktivní léze). Pacienti s hodnotami mezi 10. a 30. percentilem vykazovali minimální aktivitu na MR, kdy 1,4 % pacientů bylo asociováno s \geq 3 aktivními lézemi na MR, 5,8 % s \geq 2 aktivními lézemi a 34,8 % vykazovalo \geq 1 aktivní lézi. Pacienti, jejichž hladiny sNfL byly pod 10. percentilem, měli přítomnou

ještě nižší MR aktivitu než předchozí skupina (76,6 % pacientů <1 léze) (Uher, Schaedelin, et al. 2020).

Obrázek 10. Proporcionální rozdělení jednotlivých percentilových skupin sNfL dle počtu aktivních lézí na MR (1, 2 či ≥ 3 aktivní léze)



Obrázek převzat a upraven z článku (Uher, Schaedelin, et al. 2020)

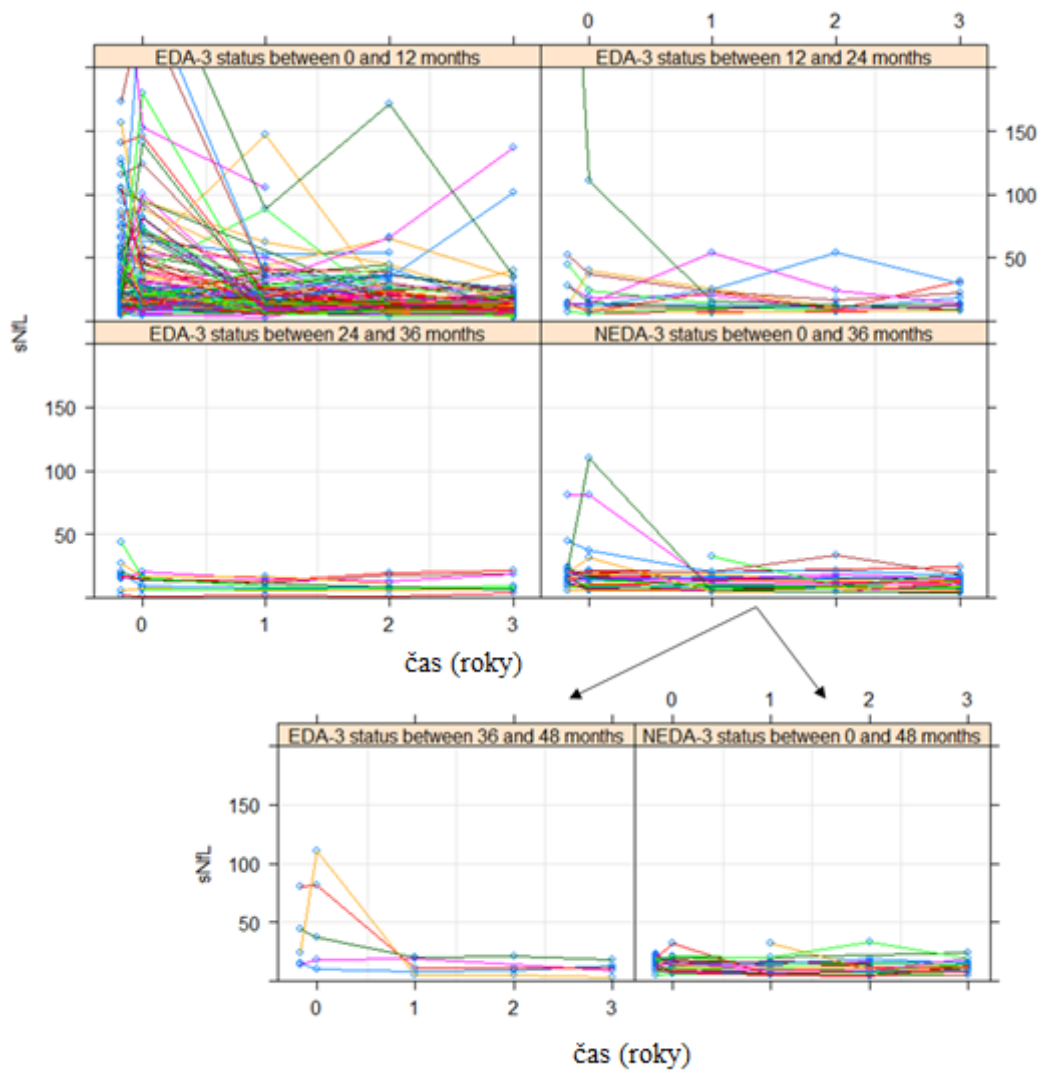
4.2.8. sNfL a NEDA-3 (No Evidence of Disease Activity) v průběhu 4letého sledování

K posouzení vývoje hladin sNfL (data dostupná po dobu 3letého sledování) a NEDA-3 statusu (data dostupná po dobu 4letého sledování) jsme se zaměřili na porovnání vývoje hladin sNfL u pacientů s aktivitou choroby (EDA-3– Evidence of Disease Activity), kteří ztratili status NEDA-3 mezi jednotlivými timepointy s pacienty, kteří si zachovali status NEDA-3 po celou dobu sledování.

Pacienti, kteří ztratili NEDA-3 v průběhu sledování, vykazovali vyšší hodnoty sNfL ve srovnání s pacienty, kteří si zachovali status NEDA-3 (Obrázek 11). Žádný z pacientů

s NEDA-3 po celou dobu 4letého sledování neměl screeningové hladiny sNfL vyšší než 25 pg/ml. Pět pacientů, kteří měli screeningové hladiny sNfL vyšší než 25 pg/ml, ale zachovaný status NEDA-3 i v měsíci 36, ztratili status NEDA-3 mezi měsícem 36 a 48 (Srpova et al. 2020).

Obrázek 11. Porovnání pacientů s aktivitou choroby (EDA) a pacientů bez aktivity choroby (NEDA) po celou dobu sledování



Obrázek převzat z článku (Srpova et al. 2020)

EDA-3 status: Evidence of Disease Activity; NEDA-3 status: No Evidence of Disease Activity

5. Diskuze

5.1. Řeč

Naše komplexní práce zahrnující 141 pacientů s RS a 70 zdravých kontrol patří mezi první práce, které využily moderní metody akustické řečové analýzy k objektivnímu zhodnocení kvantitativních parametrů řeči u pacientů s RS.

V souladu s dřívějšími pracemi jsme potvrdili, že nejčastějším typem dysartrie u pacientů s RS je mírná smíšená spasticko-ataktická dysartrie (Hartelius, Runmarker, and Andersen 2000, Darley, Brown, and Goldstein 1972). Prokázali jsme, že tato dysartrie se manifestuje odchylkami ve všech čtyřech základních řečových komponentách: fonace, orální diadochokineza, artikulace a prosodie. Nejčastěji zjištěnými abnormalitami byly odchylky v artikulaci (oslabení artikulace) a prosodii (monotónnost řeči, nadměrná variace hlasitosti a zpomalené tempo řeči).

Dle našich výsledků pomocí senzitivní akustické analýzy je dysartii možno detekovat u 56 % pacientů s diagnózou RS. Mezi nejdůležitější závěry patří možnost využití řečových abnormalit k detekci subklinického motorického postižení u pacientů s RS (78% přesnost v diskriminaci pacientů s RS bez zjevné klinické disability od skupiny zdravých kontrol) a diferenciaci pacientů s čistým pyramidovým postižením a kombinovaným pyramidovo-mozečkovým postižením.

Z výsledků porovnání řečových abnormalit s neurologickým vyšetřením jsme identifikovali nejsilnější korelaci mezi funkcí horní končetiny (9HPT) a nepravidelnou orální diadochokinezou, na níž se s největší pravděpodobností podílí zapojení přesné motorické koordinace jak v řečovém úkolu (opakování slabik v testu pa-ta-ka), tak ve zhodnocení funkce horní končetiny (rychlé vkládání kolíčků do jamek v 9HPT testu). Z doplněného vyšetření SDMT u 122 pacientů jsme prokázali silnou souvislost mezi kognicí, respektive zpomalením procesní rychlosti, a zpomalením tempa řeči. Je předmětem dalšího výzkumu, zda je toto zjištění pouze epifenomémem podmíněným samotným průběhem vyšetření (v projektu byla použita orální forma SMDT), či zda je tento vztah kauzální.

V analýze řečových a rezonančních dat jsme prokázali signifikantní závislost mezi mozkovou atrofií a dvěma řečovými parametry. Pomalá orální diadochokineza (marker ataktické dysartrie) byla úzce spojená s mozečkovou atrofií a zpomalení tempa řeči (marker

spastické dysartrie) s celkovou mozkovou atrofií a úbytkem bílé a šedé hmoty. Naše výsledky jsou v souladu s předpokládanou úlohou pyramidové dráhy a mozečku v řečových abnormalitách u pacientů s RS a potvrzují naši hypotézu o možném využití řečových parametrů v monitoraci aktivity a progresu onemocnění.

Mezi limitace této práce patří absence skupiny pacientů s výhradně cerebelárním postižením a absence porovnání s rezonančními daty zdravých kontrol.

5.2. NfL

Největší pozornost v našem výzkumu klinických a paraklinických markerů u pacientů s RS byla věnována lehkým řetězcům neurofilament (NfL). Zhodnocení jejich významu bylo provedeno na longitudinálních 4letých datech u 172 pacientů z originální kohorty SET. Z důvodu využití nové analytické metody Simoa a absence podrobných informací o základním významu sNfL, bylo jedním z našich cílů alespoň částečné objasnění podstaty sNfL jakožto markeru u pacientů s RS, jeho vztah s ostatními proměnnými (klinickými, rezonančními a laboratorními) a jeho další možné uplatnění.

Nejprve jsme se zaměřili na porovnání likvorových a sérových hladin NfL (Srпова et al. 2019). Výsledkem korelační analýzy byla vysoká asociace mezi oběma parametry ($\rho=0,81$; $p<0,001$), která byla v souladu s předchozími zjištěními (Novakova et al. 2016, Kuhle et al. 2016). V porovnání jednotlivých timepointů sNfL byla prokázána vysoká korelace mezi časnými timepointy (screen, M0 a M1) (Srпова et al. 2020). Nejsilnější byla přítomna mezi M0 a M1, a naopak nejvariabilnější hodnoty byly detekovány u screenových odběrů. Z výše zmíněných důvodů, pro absenci většího počtu vzorků v M0 a vyšší variabilitu screenových hodnot, byla pro další statistické analýzy místo baselinových hodnot využita data z M1.

Dalším krokem byla již výše zmíněná analýza zaměřená na vysvětlení významu hodnot sNfL u pacientů s RS a jejich možná podstata jakožto biomarkeru. Byla použita statistická analýza za využití „mixed-effects“ modelu (nejprve v univariátní formě a následně v multivariátní), která měla identifikovat nejslibnější nezávislé proměnné, jejichž změna podmiňuje snížení či zvýšení hladiny sNfL (byla brána v potaz procentuální změna sNfL

mezi M1 a M12, M1 a M24 a M1 a M36). Změny jednotlivých proměnných byly posuzovány mezi baseline (M0) a daným timepointem (M12, M24 a M36). Model posuzoval jednotlivé změny najednou, jednu vedle druhé. V univariátní analýze nejbližše asociovanými parametry s procentuální změnou sNfL byla absolutní změna T2LV a T1LV, nárůst počtu T2 lézí ($p < 0,001$; změna všech těchto parametrů byla porovnávána mezi M0 a M12, M0 a M24 a M0 a M36) a počet GAD lézí v jednotlivých timepointech. Jediným klinickým parametrem, u kterého byla prokázána alespoň slabá asociace se změnou sNfL, byl kumulativní počet relapsů ($p < 0,036$; opět byla brána v potaz změna mezi M0 a M12, M0 a M24 a M0 a M36). Nejspolehlivější multivariátní model, který byl schopen nejlépe vysvětlit procentuální změnu sNfL, obsahoval změnu objemu T1 lézí, kumulativní počet T2 lézí a čas od baseline. Na základě těchto výsledků společně s absencí vztahu mezi NfL a volumetrickými parametry v „cross-section“ analýze hodnotíme toto zjištění jako nepřímý průkaz tzv. zánětlivé neurodegenerace (Srpova et al. 2020).

V prediktivní analýze jsme se zaměřili především na porovnání lezionální patologie (resp. počtu GAD lézí a objemu T2 lézí na baseline) a sNfL ve schopnosti predikovat budoucí mozkovou atrofii (reprezentováno procentuální změnou objemu šedé hmoty, corpus callosum a celkového objemu mozku). sNfL se ukázaly být silnějším prediktorem mozkové atrofie než parametry lezionální patologie. Predikce atrofie pomocí sNfL již byla několikrát publikována v předchozích pracích (např. ve studii od Siller et al. v r. 2018 byla dokonce prokázána již predikce 2leté změny BPF) (Siller et al. 2018, Arrambide et al. 2016), ale doposud nebyly prokázány sNfL jako výrazně lepší prediktor než baselinové GAD léze. Toto zjištění společně s absencí „cross-section“ korelací hladin sNfL se současnými volumetrickými měřeními je důkazem, že výše sNfL nereflexuje probíhající atrofii, ale je prediktorem míry opožděné, budoucí atrofie.

Z důvodu potenciálního významu změn parametrů lipidogramu, ať již v patogenezi RS, či jako možných markerů aktivity nemoci, jsme se v subanalýze zaměřili na vztah lipidogramu a NfL (sérových i likvorových hladin). V minulosti již byly publikovány práce referující protektivní vztah HDL cholesterolu a ApoA-I na poruchu hematoencefalické bariéry, ale nebyl popisován vztah s ApoA-II, jehož podrobná úloha mezi apolipoproteiny není zatím zcela dostatečně objasněna (Murali et al. 2020, Borghini et al. 1995). Z našich výsledků vyplývá silná negativní asociace likvorových i sérových hladin NfL s hladinami ApoA-II, z nichž také usuzujeme na možný protektivní vliv ApoA-II na axonální poškození. Tento

vztah zůstal zachován i po adjustování modelu na počet GAD lézí a objemu T2 lézí jakožto markerů reprezentujících zánětlivou aktivitu nemoci. Mezi možná vysvětlení řadíme protektivní úlohu ApoA-II v zánětlivé neurodegeneraci i mimo zřejmé lezionální postižení identifikované dle MR či asociaci s tzv. „skrytým“ neuroaxonálním poškozením, které probíhá i mimo demyelinizační léze. K ozřejmění navrhované možné neuroprotektivní úlohy ApoA-II je však nutný další výzkum.

Z důvodu vysoké korelace mezi likvorovými a sérovými hladinami NfL jsme se dále zaměřili na posouzení vztahu NfL s hematoencefalickou bariérou. V rozporu s dříve publikovanými studiemi (Kalm et al. 2017, Novakova et al. 2017) jsme identifikovali silnou asociaci mezi NfL (v séru i v likvoru) a poruchou hematoencefalické bariéry, resp. likvorovou hladinou albuminu a albuminovým kvocientem. V práci Novakova et al. byly využity vzorky RS pacientů již léčených preparáty DMD, které ovlivňují/snižují propustnost hematoencefalické bariéry (Spencer, Bell, and DeLuca 2018). Naopak naše analýza byla provedena na vzorcích recentně diagnostikovaných pacientů před intravenózní terapií kortikosteroidy či zahájením terapie DMD. Tato skutečnost může představovat zásadní vliv na stav hematoencefalické bariéry a je možnou příčinou v odlišnosti v konečných výsledcích obou prací. Je nezbytné doplnění dalších podrobných studií zabývajících se stavem bariéry v souvislosti s prostupností lehkých řetězců neurofilament z CNS do periferní krve. Objasnění vztahu mezi příčinou a následkem poruchy HEB a extravazací pro-inflamatorních buněk z periferní krve by přispělo k pochopení nejen základní patogeneze onemocnění, ale zároveň objasnění vztahů mezi jednotlivými likvorovými a sérovými markery RS. V již probíhajícím zánětlivém procesu dochází bezpochyby k potenciaci obou procesů (tedy zvyšování permeability HEB s následným zvyšováním přestupu prozánětlivých buněk a vice versa) bez jasné prvotní patologie.

V analýze buněčných subpopulací v likvoru byl identifikován signifikantní vztah pouze mezi sNL a CD80+ a CD80+/CD19+ buňkami. Buňky exprimující molekulu CD80 patří mezi tzv. antigen prezentující buňky (APC), které hrají zásadní roli v patogenezi RS. Vazba CD80 jakožto ligandu na receptor CD28 či CTLA-4 představuje nezbytný kostimulační signál pro aktivaci T lymfocytů (jejich proliferaci a produkci cytokinů). Bylo již prokázáno, že při exacerbaci RS dochází ke zvýšení počtu CD80+ subpopulací, a naopak v době remise k normalizaci jejich hladin v likvoru (Genc, Dona, and Reder 1997).

Z retrospektivně stanovených hodnot laboratorních parametrů, které jsou považovány za možné rizikové faktory rozvoje RS, jsme posoudili jejich možnou asociaci s NfL. Jednalo se o pozitivitu alely *HLA DRB1*1501*, panel protilátek proti viru Epstein-Barrové a hladinu 25-hydroxyvitaminu D3. Z těchto parametrů jsme prokázali vztah pouze mezi hladinou sNfL a IgG protilátek proti virovému kapsidovému antigenu viru EBV.

Jako poslední oblast ve vztahu k NfL jsme se zaměřili na monitoraci radiologické aktivity a souvislost hladin sNfL s vývojem NEDA-3. V naší analýze jsme prokázali silný potenciál sNfL v monitoraci radiologické aktivity u pacientů s RS. Vysoké hladiny byly spojeny s aktivitou na MR v předchozích 12 měsících, a naopak nízké hladiny sNfL byly asociovány s aktivitou minimální. Celkově měli pacienti s hladinou sNfL >90. percentil téměř 4x větší pravděpodobnost výskytu ≥ 2 aktivních lézí a 6-8x větší pravděpodobnost výskytu ≥ 3 aktivních lézí ve srovnání se skupinou pacientů s hladinou sNfL mezi 30.-90. percentilem. Naopak 90 % pacientů, kteří neměli přítomnou žádnou aktivitu na MR, měli hladiny sNfL nižší než 90. percentil. Je důležité uvést, že i nezanedbatelná část pacientů (18,4 %) s vysokou hladinou sNfL (>90. percentil) neměla přítomnou žádnou aktivitu na MR. Tato skutečnost může být způsobena např. zánětlivým postižením tzv. „normálně vypadající bílé a šedé hmoty“, které je pod detekčním limitem magnetické rezonance, postižením míchy anebo se na vysoké hladině sNfL podílí akcelerovaná neurodegenerace, která však typicky v časných fázích RS není výrazně asociována s nárůstem hladin sNfL (Srpova et al. 2020, Frischer et al. 2015).

Současný potenciál využití sNfL v běžné klinické praxi se může týkat především pacientů s nízkými hladinami sNfL, jelikož 93 % pacientů s jakoukoliv aktivitou na MR mělo hladiny sNfL >10. percentil a z toho 81 % pacientů mělo vyšší hladinu sNfL než 30. percentil (Uher, Schaedelin, et al. 2020). I přes silnou asociaci mezi vysokými hladinami sNfL a aktivitou na MR, senzitivita tohoto vztahu, tedy detekce aktivity na MR v předchozím roce podle vysoké hladiny sNfL, je nízká (41 %). Možným vysvětlením je již dříve popsaná dynamika hladin sNfL, kdy vrcholu dosahují přibližně za jeden měsíc od neuroaxonálního poškození a k původním hladinám se vrací přibližně za 6 měsíců. Proto hladiny sNfL reflektují pouze recentní MR aktivitu a nevypovídají o patologické aktivitě starší >6-9 měsíců (Kuhle et al. 2019, Bergman et al. 2016).

V současné době je stabilita či aktivita nemoci často posuzována dle konceptu NEDA, přesněji dle konceptu NEDA-3 (Giovannoni et al. 2015). Jedná se o absenci klinické

(relapsu či progresu v EDSS) a rezonanční aktivity. V naší kohortě jsme porovnali vývoj hladin sNfL za dobu 3 let u pacientů, kteří zůstali po dobu 4letého sledování NEDA-3, tedy neměli žádnou klinickou či rezonanční aktivitu, s pacienty, kteří ztratili svůj status NEDA-3 v období jednotlivých timepointů (tedy mezi M0 a M12, M12 a M24, M24 a M36 a M36 a M48). V souladu s předchozími zjištěními jsme prokázali, že pacienti bez přítomné aktivity nemoci mají v průběhu sledování nižší hladiny sNfL než pacienti s aktivitou nemoci (Hakansson et al. 2018). Všichni pacienti, kteří si zachovali po celou dobu sledování status NEDA-3, neměli screeningové hodnoty sNfL vyšší než 25pg/ml. Do prvotní analýzy nebyly zahrnuty informace o GAD lézích. Po začlenění údajů o přítomnosti GAD lézí, zůstaly výsledky identické.

Naše komplexní práce zaměřená na posouzení NfL u pacientů s RS nebyla bez limitací:

1) Mezi základní limitace patřila absence nedostatečného počtu baselinových sér, kvůli čemuž musely být ke statistické analýze využity hladiny sNfL z M1. Avšak z důvodu výrazné korelace obou timepointů ($\rho=0,93$, $p<0,001$) a využití procentuální změny sNfL namísto absolutních hodnot by tato záměna neměla mít žádný vliv na naše závěry. Pro validaci našich výsledků vyplývajících z posouzení vztahu sNfL s ostatními parametry, včetně predikční analýzy, byla provedena identická analýza s využitím screenových dat hladin sNfL se shodným výsledkem.

2) Naše zkoumaná kohorta pacientů z originální skupiny SET obsahovala pouze pacienty v časných fázích onemocnění, u kterých byla jako první DMD léčba zahájena terapií intramuskulárním interferonem beta-1a (Avonex). Tato skutečnost může představovat limitaci v aplikaci našich zjištění na odlišné skupiny pacientů s RS (jiný druh terapie DMD, vyšší disabilita, SP RS, PP RS). Proto je nezbytný další výzkum zabývající se NfL u těchto odlišných kohort.

3) Při posuzování statusu NEDA-3 či EDA-3 ve vztahu k sNfL jsme měli k dispozici pouze hladiny sNfL za dobu 3letého sledování namísto 4letého sledování, které bylo dostupné u rezonančního a klinického zhodnocení.

I přes výše uvedené limitace byla uniformnost kohorty s přesně stanoveným protokolem přínosem pro pozdější hodnocení získaných výsledků. Ať už v absenci vlivu terapie kortikoidy v době odběru screenových vzorků, v absolvování všech MR vyšetření na

identickém přístroji a v neposlední řadě relativně dlouhou dobou sledování s dostatkem klinických, rezonančních i odběrových timepointů.

6. Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz

6.1. Řeč

6.1.1. Závěry

- Prevalence dysartrie u pacientů s RS byla 56 % s největším podílem spasticko-ataktické dysartrie.
- Řečové abnormality jsme prokázali již u pacientů s minimálním neurologickým postižením.
- Nejčastějšími abnormalitami byly odchylky v artikulaci a prosodii.
- Byla prokázána korelace orální diadochokinezy se zhodnocením funkce horní končetiny.
- Abnormality řečových parametrů byly asociovány s globální i regionální mozkovou atrofií.

6.1.2. Zhodnocení cílů a hypotéz

1. Primární cíl, porovnání řečových parametrů u pacientů s RS a zdravých kontrol, byl splněn.
2. Sekundární cíl, porovnání řečových parametrů s dalšími klinickými a paraklinickými markery, byl splněn.
3. Hypotéza, že akustická analýza řeči je schopná odlišit zdravé kontroly od pacientů s RS, byla potvrzena.
4. Hypotéza, že abnormální řečové parametry jsou schopné odlišit pacienty s převážně pyramidovým či mozečkovým postižením, nebyla potvrzena, a to z důvodu absence čisté mozečkové skupiny pacientů. Bylo však prokázáno, že řečové abnormality jsou schopné diferencovat pacienty s výhradně pyramidovým postižením od pacientů se smíšeným postižením pyramidovým a cerebelárním.
5. Hypotéza, že řečové abnormality korelují s rezonančními parametry celkové a regionální atrofie, byla potvrzena.

6.2. NfL

6.2.1. Závěry

- Byla potvrzena vysoká korelace mezi sérovými a likvorovými hladinami NfL.
- sNfL reflektují probíhající zánět CNS a jsou markerem tzv. zánětlivé neurodegenerace.
- sNfL nereflektují současnou mozkovou atrofií, ale predikují atrofii opožděnou, budoucí.
- Nízké hladiny sNfL jsou spojené s minimální radiologickou aktivitou, respektive vypovídají o absenci aktivity na MR v předchozím roce.
- U pacientů splňující kritéria NEDA-3 byly prokázány nízké hladiny sNfL v průběhu několikaletého sledování.
- Sérová hladina NfL je asociována s poruchou hematoencefalické bariéry.
- Byla prokázána možná souvislost NfL s parametry lipidogramu.

6.2.2. Zhodnocení cílů a hypotéz

1. Primární cíl, posouzení sNfL jako markeru aktivity onemocnění, byl splněn.
2. Sekundární cíl, porovnání NfL s ostatními biochemickými parametry, byl splněn.
3. Hypotéza, že hladina sNfL odpovídá klinické aktivitě nemoci, se jednoznačně nepotvrdila.
4. Hypotéza, že hladina sNfL odpovídá radiologické aktivitě nemoci, se potvrdila.
5. Hypotéza, že sNfL jsou prediktorem klinické aktivity nemoci, se potvrdila.
6. Hypotéza, že sNfL jsou prediktorem mozkové atrofie, se potvrdila.
7. Hypotéza, že hladina sNfL koreluje s tíží poruchy hematoencefalické bariéry, se potvrdila.

7. Souhrny

7.1. Souhrn

Předmětem této práce bylo posouzení dvou slibných biomarkerů a jejich možné využití ve sledování aktivity nemoci u pacientů s RS. Hlavní prostor byl věnován lehkým řetězcům neurofilament, a to především jejich sérovým hladinám. Druhým zkoumaným markerem byla řeč.

Dle provedené akustické analýzy jsme prokázali, že řečové abnormality mohou být přítomny již u pacientů bez jinak zjevné disability (EDSS<2). Korelace řečového postižení s mozkovou atrofií představuje potenciál v možnosti využití řečových parametrů v hodnocení aktivity nemoci v běžné klinické praxi. Za předpokladu vybrání vhodných řečových testů v kombinaci s jejich jednoduchým vyhodnocením by vyšetření řeči mohlo představovat přínosné rozšíření běžného neurologického vyšetření a hodnocení dle EDSS.

Ve stěžejní části práce, která se věnovala lehkým řetězcům neurofilament, jsme prokázali, že sNfL u pacientů v časných fázích RS reflektují především současnou zánětlivou aktivitu a predikují budoucí mozkovou atrofií. Potvrdili jsme silnou korelaci mezi hladinami NfL v likvoru a séru, na níž se dle našich zjištění podílí porucha hematoencefalické bariéry. K ozřejmění přesného vztahu a kauzality mezi sNfL a HEB je potřeba dalšího výzkumu, obdobně jako u zjištěné asociace mezi hladinami sNfL a ApoA-II, jež může hrát důležitou protektivní roli v probíhající neurodegeneraci.

Velký potenciál pro běžnou klinickou praxi představuje především zjištění, že vysoké hladiny sNfL jsou schopné identifikovat aktivitu na MR v předchozím roce, a naopak nízké hladiny sNfL jsou spojené s minimální či žádnou rezonanční aktivitou. V souladu s tímto zjištěním také souvisí průkaz nízkých hladin sNfL u pacientů se statusem NEDA-3 po dobu několikaletého sledování.

Veškerá výše uvedená zjištění podporují využití sNfL jako vhodného markeru pro sledování aktivity nemoci u pacientů s RS.

7.2. Summary

The aim of this study was to evaluate speech parameters and neurofilament light chains as potential markers of disease activity in patients with multiple sclerosis. The most important findings of speech analysis were presence of speech abnormalities in patients with minimal disability (EDSS <2) and correlation of speech pathology with global or regional brain atrophy.

The main part of this work was focused on NfL, especially sNfL, as currently the most promising biomarker in multiple sclerosis. We found out that level of sNfL are associated with inflammation-driven neurodegeneration and are able to predict future brain atrophy. Meaningful result was connectin low level of sNfL with minimal radiological activity in previous year. It supposed to be potential of using sNfL in combination with magnetic resonance imaging in regular monitoring of disease activity in patients with multiple sclerosis. Important findinng for assessment of sNfL itself was association of sNfL and dysfunction of HEB. Additional, possible relation of level of sNfL and parameters of lipidogram was proven.

sNfL represent complex and useful biomarker for monitoring disease activity in patients with multiple sclerosis.

8. Seznam literatury

- Al-Chalabi, A., and C. C. Miller. 2003. "Neurofilaments and neurological disease." *Bioessays* 25 (4):346-55. doi: 10.1002/bies.10251.
- Andelova, Michaela, Tomas Uher, Jan Krasensky, Lukas Sobisek, Eliska Kusova, Barbora Srpova, Karolina Vodehnalova, Lucie Friedova, Jiri Motyl, and Jana Lizrova Preiningerova. 2019. "Additive Effect of Spinal Cord Volume, Diffuse and Focal Cord Pathology on Disability in Multiple Sclerosis." *Frontiers in neurology* 10.
- Arrambide, G., C. Espejo, H. Eixarch, L. M. Villar, J. C. Alvarez-Cermeno, C. Picon, J. Kuhle, G. Disanto, L. Kappos, J. Sastre-Garriga, D. Pareto, E. Simon, M. Comabella, J. Rio, C. Nos, C. Tur, J. Castillo, A. Vidal-Jordana, I. Galan, M. J. Arevalo, C. Auger, A. Rovira, X. Montalban, and M. Tintore. 2016. "Neurofilament light chain level is a weak risk factor for the development of MS." *Neurology*. doi: 10.1212/WNL.0000000000003085.
- Barro, C., P. Benkert, G. Disanto, C. Tsagkas, M. Amann, Y. Naegelin, D. Leppert, C. Gobbi, C. Granziera, O. Yaldizli, Z. Michalak, J. Wuerfel, L. Kappos, K. Parmar, and J. Kuhle. 2018. "Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis." *Brain*. doi: 10.1093/brain/awy154.
- Benjamini, Yoav, and Yosef Hochberg. 1995. "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing." *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)* 57 (1):289-300.
- Benova, B, L Sobisek, T Uher, K Kucerova, E Havrdova, and D Horakova. 2016. "The best clinical correlates of employment status in patients with multiple sclerosis." *MULTIPLE SCLEROSIS JOURNAL*.
- Bergman, J., A. Dring, H. Zetterberg, K. Blennow, N. Norgren, J. Gilthorpe, T. Bergenheim, and A. Svenningsson. 2016. "Neurofilament light in CSF and serum is a sensitive marker for axonal white matter injury in MS." *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 3 (5):e271. doi: 10.1212/NXI.0000000000000271.
- Bhan, A., C. Jacobsen, K. M. Myhr, I. Dalen, K. Lode, and E. Farbu. 2018. "Neurofilaments and 10-year follow-up in multiple sclerosis." *Mult Scler* 24 (10):1301-1307. doi: 10.1177/1352458518782005.
- Bielekova, B., and R. Martin. 2004. "Development of biomarkers in multiple sclerosis." *Brain* 127 (Pt 7):1463-78. doi: 10.1093/brain/awh176.

- Borghini, Isabelle, Francisco Barja, Daniel Pometta, and Richard W James. 1995. "Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1255 (2):192-200.
- Comabella, M., M. Fernandez, R. Martin, S. Rivera-Vallve, E. Borrás, C. Chiva, E. Julia, A. Rovira, E. Canto, J. C. Alvarez-Cermeno, L. M. Villar, M. Tintore, and X. Montalban. 2010. "Cerebrospinal fluid chitinase 3-like 1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis." *Brain* 133:1082-1093. doi: 10.1093/brain/awq035.
- Comabella, M., and X. Montalban. 2014. "Body fluid biomarkers in multiple sclerosis." *Lancet Neurology* 13 (1):113-126.
- Compston, A., and A. Coles. 2008. "Multiple sclerosis." *Lancet* 372 (9648):1502-17. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
- Darley, Frederic L, Joe R Brown, and Norman P Goldstein. 1972. "Dysarthria in multiple sclerosis." *Journal of Speech and Hearing research* 15 (2):229-245.
- Dendrou, Calliope A, Lars Fugger, and Manuel A Friese. 2015. "Immunopathology of multiple sclerosis." *Nature Reviews Immunology* 15 (9):545-558.
- Disanto, G., C. Barro, P. Benkert, Y. Naegelin, S. Schadelin, A. Giardiello, C. Zecca, K. Blennow, H. Zetterberg, D. Leppert, L. Kappos, C. Gobbi, J. Kuhle, and Group Swiss Multiple Sclerosis Cohort Study. 2017. "Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis." *Ann Neurol* 81 (6):857-870. doi: 10.1002/ana.24954.
- Duffy, Joseph R. 2013. *Motor speech disorders : substrates, differential diagnosis, and management*. Third edition. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Fialova, L., A. Bartos, J. Svarcova, D. Zimova, J. Kotoucova, and I. Malbohan. 2013. "Serum and cerebrospinal fluid light neurofilaments and antibodies against them in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis." *Journal of Neuroimmunology* 262 (1-2):113-120. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.06.010.
- Fischer, J. S., A. J. Jak, J. E. Kniker, R. A. Rudick, and G. Cutter. 2001. "Multiple sclerosis functional composite measure (msfc): Administration and scoring manual (revised), National Multiple Sclerosis Society."
- Freedman, M. S., E. J. Thompson, F. Deisenhammer, G. Giovannoni, G. Grimsley, G. Keir, S. Ohman, M. K. Racke, M. Sharief, C. J. Sindic, F. Sellebjerg, and W. W. Tourtellotte. 2005. "Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of

- multiple sclerosis: a consensus statement." *Arch Neurol* 62 (6):865-70. doi: 10.1001/archneur.62.6.865.
- Friedewald, W. T., R. I. Levy, and D. S. Fredrickson. 1972. "Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge." *Clin Chem* 18 (6):499-502.
- Friedova, L., J. Ruzs, J. Motyl, B. Srpova, K. Vodehnalova, M. Andelova, K. Novotna, M. Novotny, H. Ruzickova, T. Tykalova, E. Kubala Havrdova, D. Horakova, and T. Uher. 2019. "Slowed articulation rate is associated with information processing speed decline in multiple sclerosis: A pilot study." *J Clin Neurosci* 65:28-33. doi: 10.1016/j.jocn.2019.04.018.
- Frischer, J. M., S. D. Weigand, Y. Guo, N. Kale, J. E. Parisi, I. Pirko, J. Mandrekar, S. Bramow, I. Metz, W. Bruck, H. Lassmann, and C. F. Lucchinetti. 2015. "Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque." *Ann Neurol* 78 (5):710-21. doi: 10.1002/ana.24497.
- Fuchs, Elaine, and Don W Cleveland. 1998. "A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease." *Science* 279 (5350):514-519.
- Genc, K., D. L. Dona, and A. T. Reder. 1997. "Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy." *J Clin Invest* 99 (11):2664-71. doi: 10.1172/JCI119455.
- Giovannoni, G., B. Turner, S. Gnanapavan, C. Offiah, K. Schmierer, and M. Marta. 2015. "Is it time to target no evident disease activity (NEDA) in multiple sclerosis?" *Mult Scler Relat Disord* 4 (4):329-33. doi: 10.1016/j.msard.2015.04.006.
- Gisslén, Magnus, Richard W Price, Ulf Andreasson, Niklas Norgren, Staffan Nilsson, Lars Hagberg, Dietmar Fuchs, Serena Spudich, Kaj Blennow, and Henrik Zetterberg. 2016. "Plasma concentration of the neurofilament light protein (NFL) is a biomarker of CNS injury in HIV infection: a cross-sectional study." *EBioMedicine* 3:135-140.
- Hakansson, I., A. Tisell, P. Cassel, K. Blennow, H. Zetterberg, P. Lundberg, C. Dahle, M. Vrethem, and J. Ernerudh. 2018. "Neurofilament levels, disease activity and brain volume during follow-up in multiple sclerosis." *J Neuroinflammation* 15 (1):209. doi: 10.1186/s12974-018-1249-7.
- Hartelius, Lena, and Malin Lillvik. 2003. "Lip and tongue function differently affected in individuals with multiple sclerosis." *Folia phoniatrica et logopaedica* 55 (1):1-9.

- Hartelius, Lena, Björn Runmarker, and Oluf Andersen. 2000. "Prevalence and characteristics of dysarthria in a multiple-sclerosis incidence cohort: relation to neurological data." *Folia phoniatrica et logopaedica* 52 (4):160-177.
- Havrdová, Eva. 2013. *Roztroušená skleróza*.
- Heneka, Michael T, Markus P Kummer, and Eicke Latz. 2014. "Innate immune activation in neurodegenerative disease." *Nature Reviews Immunology* 14 (7):463-477.
- Herz, J., F. Zipp, and V. Siffrin. 2010. "Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation." *Exp Neurol* 225 (1):9-17. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.11.019.
- Hlavnicka, J., R. Cmejla, T. Tykalova, K. Sonka, E. Ruzicka, and J. Rusz. 2017. "Automated analysis of connected speech reveals early biomarkers of Parkinson's disease in patients with rapid eye movement sleep behaviour disorder." *Sci Rep* 7 (1):12. doi: 10.1038/s41598-017-00047-5.
- Hoffman, P. N., and R. J. Lasek. 1975. "The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons." *J Cell Biol* 66 (2):351-66.
- Horakova, D., T. Kalincik, O. Dolezal, J. Krasensky, M. Vaneckova, Z. Seidl, and E. Havrdova. 2012. "Early predictors of non-response to interferon in multiple sclerosis." *Acta Neurol Scand* 126 (6):390-7. doi: 10.1111/j.1600-0404.2012.01662.x.
- Janmey, Paul A, Jean-Francois Leterrier, and Harald Herrmann. 2003. "Assembly and structure of neurofilaments." *Current opinion in colloid & interface science* 8 (1):40-47.
- Kadrnozka, L., M. Vaneckova, L. Sobisek, B. Benova, K. Kucerova, J. Motyl, M. Anelova, K. Novotna, J. Lizrova Preiningerova, J. Krasensky, E. Havrdova, D. Horakova, and T. Uher. 2018. "Combining clinical and magnetic resonance imaging markers enhances prediction of 12-year employment status in multiple sclerosis patients." *J Neurol Sci* 388:87-93. doi: 10.1016/j.jns.2018.02.045.
- Kalincik, T., M. Vaneckova, M. Tyblova, J. Krasensky, Z. Seidl, E. Havrdova, and D. Horakova. 2012. "Volumetric MRI markers and predictors of disease activity in early multiple sclerosis: a longitudinal cohort study." *PLoS One* 7 (11):e50101. doi: 10.1371/journal.pone.0050101.
- Kalm, Marie, Martina Boström, Åsa Sandelius, Yohanna Eriksson, C Joakim Ek, Kaj Blennow, Thomas Björk-Eriksson, and Henrik Zetterberg. 2017. "Serum concentrations of the axonal injury marker neurofilament light protein are not influenced by blood-brain barrier permeability." *Brain research* 1668:12-19.

- Khalil, M., C. E. Teunissen, M. Otto, F. Piehl, M. P. Sormani, T. Gattringer, C. Barro, L. Kappos, M. Comabella, F. Fazekas, A. Petzold, K. Blennow, H. Zetterberg, and J. Kuhle. 2018. "Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders." *Nat Rev Neurol* 14 (10):577-589. doi: 10.1038/s41582-018-0058-z.
- Kobelt, Gisela, Alan Thompson, Jenny Berg, Mia Gannedahl, and Jennifer Eriksson. 2017. "New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe." *Multiple Sclerosis Journal*:1352458517694432.
- Konstantopoulos, Kostas, Michail Vikelis, John Anthony Seikel, and Dimos-Dimitrios Mitsikostas. 2010. "The existence of phonatory instability in multiple sclerosis: an acoustic and electroglottographic study." *Neurological Sciences* 31 (3):259-268.
- Kremenutzky, M, GPA Rice, J Baskerville, Dean Marko Wingerchuk, and GC Ebers. 2006. "The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease." *Brain* 129 (3):584-594.
- Kuhle, J., C. Barro, U. Andreasson, T. Derfuss, R. Lindberg, A. Sandelius, V. Liman, N. Norgren, K. Blennow, and H. Zetterberg. 2016. "Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa." *Clin Chem Lab Med* 54 (10):1655-1661. doi: 10.1515/cclm-2015-1195.
- Kuhle, J., H. Kropshofer, D. A. Haering, U. Kundu, R. Meinert, C. Barro, F. Dahlke, D. Tomic, D. Leppert, and L. Kappos. 2019. "Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response." *Neurology* 92 (10):e1007-e1015. doi: 10.1212/WNL.0000000000007032.
- Kurtzke, J. F. 1983. "RATING NEUROLOGIC IMPAIRMENT IN MULTIPLE-SCLEROSIS - AN EXPANDED DISABILITY STATUS SCALE (EDSS)." *Neurology* 33 (11):1444-1452.
- Lassmann, H. 2004. "Experimental autoimmune encephalomyelitis." *Myelin Biology and Disorders* 2.
- Lycke, J. N., J. E. Karlsson, O. Andersen, and L. E. Rosengren. 1998. "Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64 (3):402-4.
- McComb, Mason, Maggie Krikheli, Tomas Uher, Richard W Browne, Barbora Srpova, Johanna Oechtering, Aleksandra Maleska Maceski, Michaela Tyblova, Dejan Jakimovski, and Deepa P Ramasamy. 2020. "Neuroprotective associations of apolipoproteins AI and A-

- II with neurofilament levels in early multiple sclerosis." *Journal of Clinical Lipidology* 14 (5):675-684. e2.
- Murali, Nitya, Richard W Browne, K Fellows Maxwell, Mary Lou Bodziak, Dejan Jakimovski, Jesper Hagemeyer, Niels Bergsland, Bianca Weinstock-Guttman, Robert Zivadinov, and Murali Ramanathan. 2020. "Cholesterol and neurodegeneration: longitudinal changes in serum cholesterol biomarkers are associated with new lesions and gray matter atrophy in multiple sclerosis over 5 years of follow-up." *European Journal of Neurology* 27 (1):188-e4.
- Novakova, L, M Axelsson, C Malmstrom, H Zetterberg, K Blennow, and J Lycke. 2016. "Neurofilament light in serum: A potential biomarker for monitoring treatment efficacy in RRMS." *MULTIPLE SCLEROSIS JOURNAL*.
- Novakova, L., H. Zetterberg, P. Sundstrom, M. Axelsson, M. Khademi, M. Gunnarsson, C. Malmstrom, A. Svenningsson, T. Olsson, F. Piehl, K. Blennow, and J. Lycke. 2017. "Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein." *Neurology* 89 (22):2230-2237. doi: 10.1212/WNL.0000000000004683.
- Polman, C. H., S. C. Reingold, B. Banwell, M. Clanet, J. A. Cohen, M. Filippi, K. Fujihara, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, F. D. Lublin, X. Montalban, P. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A. J. Thompson, E. Waubant, B. Weinshenker, and J. S. Wolinsky. 2011. "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria." *Ann Neurol* 69 (2):292-302. doi: 10.1002/ana.22366.
- Poser, C. M., D. W. Paty, L. Scheinberg, W. I. McDonald, F. A. Davis, G. C. Ebers, K. P. Johnson, W. A. Sibley, D. H. Silberberg, and W. W. Tourtellotte. 1983. "New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols." *Ann Neurol* 13 (3):227-31. doi: 10.1002/ana.410130302.
- Presslauer, S., D. Milosavljevic, T. Brücke, P. Bayer, and W. Hübl. 2008. "Elevated levels of kappa free light chains in CSF support the diagnosis of multiple sclerosis." *J Neurol* 255 (10):1508-14. doi: 10.1007/s00415-008-0954-z.
- Rusz, J., B. Benova, H. Ruzickova, M. Novotny, T. Tykalova, J. Hlavnicka, T. Uher, M. Vaneckova, M. Anelova, K. Novotna, L. Kadrnozka, and D. Horakova. 2017. "Characteristics of motor speech phenotypes in multiple sclerosis." *Mult Scler Relat Disord* 19:62-69. doi: 10.1016/j.msard.2017.11.007.
- Rusz, J., R. Cmejla, H. Ruzickova, and E. Ruzicka. 2011. "Quantitative acoustic measurements for characterization of speech and voice disorders in early untreated Parkinson's disease." *J Acoust Soc Am* 129 (1):350-67. doi: 10.1121/1.3514381.

- Rusz, J., M. Vaneckova, B. Benova, T. Tykalova, M. Novotny, H. Ruzickova, T. Uher, M. Anelova, K. Novotna, L. Friedova, J. Motyl, K. Kucerova, J. Krasensky, and D. Horakova. 2019. "Brain volumetric correlates of dysarthria in multiple sclerosis." *Brain Lang* 194:58-64. doi: 10.1016/j.bandl.2019.04.009.
- Salzer, J., A. Svenningsson, and P. Sundstrom. 2010. "Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis." *Mult Scler* 16 (3):287-92. doi: 10.1177/1352458509359725.
- Siller, N., J. Kuhle, M. Muthuraman, C. Barro, T. Uphaus, S. Groppa, L. Kappos, F. Zipp, and S. Bittner. 2018. "Serum neurofilament light chain is a biomarker of acute and chronic neuronal damage in early multiple sclerosis." *Mult Scler*:1352458518765666. doi: 10.1177/1352458518765666.
- Sormani, M. P., D. A. Haering, H. Kropshofer, D. Leppert, U. Kundu, C. Barro, L. Kappos, D. Tomic, and J. Kuhle. 2019. "Blood neurofilament light as a potential endpoint in Phase 2 studies in MS." *Ann Clin Transl Neurol* 6 (6):1081-1089. doi: 10.1002/acn3.795.
- Spencer, J. I., J. S. Bell, and G. C. DeLuca. 2018. "Vascular pathology in multiple sclerosis: reframing pathogenesis around the blood-brain barrier." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 89 (1):42-52. doi: 10.1136/jnnp-2017-316011.
- Sriram, S., and I. Steiner. 2005. "Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis." *Ann Neurol* 58 (6):939-45. doi: 10.1002/ana.20743.
- Srpova, B., T. Uher, T. Hrciarova, C. Barro, M. Anelova, Z. Michalak, M. Vaneckova, J. Krasensky, L. Noskova, E. K. Havrdova, J. Kuhle, and D. Horakova. 2020. "Serum neurofilament light chain reflects inflammation-driven neurodegeneration and predicts delayed brain volume loss in early stage of multiple sclerosis." *Mult Scler*:1352458519901272. doi: 10.1177/1352458519901272.
- Srpova, Barbora, Christian Barro, Libuse Noskova, Tomas Uher, Zuzanna Michalak, Michaela Tyblova, Eva Kubala Havrdova, Jens Kuhle, and Dana Horakova. 2019. "Stanovení lehkých řetězců neurofilament v likvoru a séru u pacientů s relaps remitentní roztroušenou sklerózou." CSNS, Prague.
- Stys, P. K., G. W. Zamponi, J. van Minnen, and J. J. Geurts. 2012. "Will the real multiple sclerosis please stand up?" *Nat Rev Neurosci* 13 (7):507-14. doi: 10.1038/nrn3275.
- Szaro, Ben G, and Michael J Strong. 2010. "Post-transcriptional control of neurofilaments: New roles in development, regeneration and neurodegenerative disease." *Trends in neurosciences* 33 (1):27-37.

- Teunissen, C. E., E. Iacobaeus, M. Khademi, L. Brundin, N. Norgren, M. J. A. Koel-Simmelink, M. Schepens, F. Bouwman, H. A. M. Twaalfhoven, H. J. Blom, C. Jakobs, and C. D. Dijkstra. 2009. "Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis." *Neurology* 72 (15):1322-1329. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181a0fe3f.
- Teunissen, C. E., and M. Khalil. 2012. "Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis." *Mult Scler* 18 (5):552-6. doi: 10.1177/1352458512443092.
- Teunissen, C. E., A. Petzold, J. L. Bennett, F. S. Berven, L. Brundin, M. Comabella, D. Franciotta, J. L. Frederiksen, J. O. Fleming, R. Furlan, R. Q. Hintzen, S. G. Hughes, M. H. Johnson, E. Krasulova, J. Kuhle, M. C. Magnone, C. Rajda, K. Rejdak, H. K. Schmidt, V. van Pesch, E. Waubant, C. Wolf, G. Giovannoni, B. Hemmer, H. Tumani, and F. Deisenhammer. 2009. "A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking." *Neurology* 73 (22):1914-22. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c47cc2.
- Teunissen, C., T. Menge, A. Altintas, J. C. Alvarez-Cermeno, A. Bertolotto, F. S. Berven, L. Brundin, M. Comabella, M. Degn, F. Deisenhammer, F. Fazekas, D. Franciotta, J. L. Frederiksen, D. Galimberti, S. Gnanapavan, H. Hegen, B. Hemmer, R. Hintzen, S. Hughes, E. Iacobaeus, A. C. Kroksveen, J. Kuhle, J. Richert, H. Tumani, L. M. Villar, J. Drulovic, I. Dujmovic, M. Khalil, and A. Bartos. 2013. "Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarker studies in multiple sclerosis." *Multiple Sclerosis Journal* 19 (13):1802-1809. doi: 10.1177/1352458513488232.
- Thompson, A. J., B. L. Banwell, F. Barkhof, W. M. Carroll, T. Coetzee, G. Comi, J. Correale, F. Fazekas, M. Filippi, M. S. Freedman, K. Fujihara, S. L. Galetta, H. P. Hartung, L. Kappos, F. D. Lublin, R. A. Marrie, A. E. Miller, D. H. Miller, X. Montalban, E. M. Mowry, P. S. Sorensen, M. Tintore, A. L. Traboulsee, M. Trojano, B. M. J. Uitdehaag, S. Vukusic, E. Waubant, B. G. Weinshenker, S. C. Reingold, and J. A. Cohen. 2018. "Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria." *Lancet Neurol* 17 (2):162-173. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
- Trapp, B. D., and K. A. Nave. 2008. "Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?" *Annu Rev Neurosci* 31:247-69. doi: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313.
- Trapp, B. D., J. Peterson, R. M. Ransohoff, R. Rudick, S. Mork, and L. Bo. 1998. "Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis." *N Engl J Med* 338 (5):278-85. doi: 10.1056/NEJM199801293380502.

- Tsunoda, I., and R. S. Fujinami. 2002. "Inside-Out versus Outside-In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination." *Springer Semin Immunopathol* 24 (2):105-25. doi: 10.1007/s00281-002-0105-z.
- Uher, T., D. Horakova, T. Kalincik, N. Bergsland, M. Tyblova, D. P. Ramasamy, Z. Seidl, M. Vaneckova, J. Krasensky, E. Havrdova, and R. Zivadinov. 2015. "Early magnetic resonance imaging predictors of clinical progression after 48 months in clinically isolated syndrome patients treated with intramuscular interferon beta-1a." *Eur J Neurol* 22 (7):1113-23. doi: 10.1111/ene.12716.
- Uher, T., J. Krasensky, M. Vaneckova, L. Sobisek, Z. Seidl, E. Havrdova, N. Bergsland, M. G. Dwyer, D. Horakova, and R. Zivadinov. 2017. "A Novel Semiautomated Pipeline to Measure Brain Atrophy and Lesion Burden in Multiple Sclerosis: A Long-Term Comparative Study." *Journal of Neuroimaging*. doi: 10.1111/jon.12445.
- Uher, T., S. Schaedelin, B. Srpova, C. Barro, N. Bergsland, M. Dwyer, M. Tyblova, K. Vodehnalova, P. Benkert, J. Oechtering, D. Leppert, Y. Naegelin, J. Krasensky, M. Vaneckova, E. Kubala Havrdova, L. Kappos, R. Zivadinov, D. Horakova, J. Kuhle, and T. Kalincik. 2020. "Monitoring of radiologic disease activity by serum neurofilaments in MS." *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 7 (4). doi: 10.1212/NXI.0000000000000714.
- Uher, Tomas, Mason McComb, Shery Galkin, Barbora Srpova, Johanna Oechtering, Christian Barro, Michaela Tyblova, Niels Bergsland, Jan Krasensky, and Michael Dwyer. 2020. "Neurofilament levels are associated with blood–brain barrier integrity, lymphocyte extravasation, and risk factors following the first demyelinating event in multiple sclerosis." *Multiple Sclerosis Journal*:1352458520912379.
- www.multiplesclerosis.cz. "www.multiplesclerosis.cz."
- Yuan, A., M. V. Rao, Veeranna, and R. A. Nixon. 2017. "Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9 (4). doi: 10.1101/cshperspect.a018309.
- Yuan, Aidong, Mala V Rao, and Ralph A Nixon. 2017. "Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9 (4):a018309.

9. Seznam publikací

9.1. Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

Srpova, B., T. Uher, T. Hrnčiarová, C. Barro, M. Anđelová, Z. Michalák, M. Vanečková, J. Krasenský, L. Nosková, E. K. Havrdová, J. Kuhle and D. Horáková (2020). "Serum neurofilament light chain reflects inflammation-driven neurodegeneration and predicts delayed brain volume loss in early stage of multiple sclerosis." *Mult Scler*: 1352458519901272. IF 5,649

Uher, T., S. Schaedelin, B. Srpova, C. Barro, N. Bergsland, M. Dwyer, M. Tyblova, K. Vodehnalova, P. Benkert, J. Oechtering, D. Leppert, Y. Naegelin, J. Krasensky, M. Vaneckova, E. Kubala Havrdova, L. Kappos, R. Zivadinov, D. Horakova, J. Kuhle and T. Kalincik (2020). "Monitoring of radiologic disease activity by serum neurofilaments in MS." *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 7(4). IF 7,724

Uher, Tomas, Mason McComb, Shery Galkin, Barbora Srpova, Johanna Oechtering, Christian Barro, Michaela Tyblova, Niels Bergsland, Jan Krasensky, and Michael Dwyer. 2020. "Neurofilament levels are associated with blood–brain barrier integrity, lymphocyte extravasation, and risk factors following the first demyelinating event in multiple sclerosis." *Multiple Sclerosis Journal*:1352458520912379. IF 5,649

McComb, Mason, Maggie Krikheli, Tomas Uher, Richard W Browne, Barbora Srpova, Johanna Oechtering, Aleksandra Maleska Maceski, Michaela Tyblova, Dejan Jakimovski, and Deepa P Ramasamy. 2020. 'Neuroprotective associations of apolipoproteins AI and A-II with neurofilament levels in early multiple sclerosis', *Journal of Clinical Lipidology*, 14: 675-84. e2. IF 3,58

Rusz, J., B. Benova, H. Ruzickova, M. Novotny, T. Tykalova, J. Hlavnicka, T. Uher, M. Vaneckova, M. Anđelová, K. Novotna, L. Kadrnozkova and D. Horáková (2017). "Characteristics of motor speech phenotypes in multiple sclerosis." *Mult Scler Relat Disord* 19: 62-69. IF 2,725

Rusz, J., M. Vaneckova, B. Benova, T. Tykalova, M. Novotny, H. Ruzickova, T. Uher, M. Anđelová, K. Novotna, L. Friedova, J. Motyl, K. Kucerova, J. Krasensky and D. Horáková (2019). "Brain volumetric correlates of dysarthria in multiple sclerosis." *Brain Lang* 194: 58-64. IF 2,339

Friedova, L., J. Rusz, J. Motyl, B. Srpova, K. Vodehnalova, M. Anđelová, K. Novotna, M. Novotny, H. Ruzickova, T. Tykalova, E. Kubala Havrdova, D. Horakova and T. Uher (2019). "Slowed articulation rate is associated with information processing speed decline in multiple sclerosis: A pilot study." *J Clin Neurosci* 65: 28-33. IF 1,76

9.2. Publikace in extenso, které nejsou podkladem disertace

Preiningerova, J. L., Grishko, A., Sobisek, L., Andelova, M., Benova, B., Kucerova, K., & Havrdova, E. K. (2018). Do eyes with and without optic neuritis in multiple sclerosis age equally?. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 14, 2281. IF 2,228

Andelova, M., Uher, T., Krasensky, J., Sobisek, L., Kusova, E., Srpova, B., & Havrdova, E. K. (2019). Additive Effect of Spinal Cord Volume, Diffuse and Focal Cord Pathology on Disability in Multiple Sclerosis. *Frontiers in neurology*, 10. IF 2,889

Kadrnozkova, L., M. Vaneckova, L. Sobisek, B. Benova, K. Kucerova, J. Motyl, M. Andelova, K. Novotna, J. Lizrova Preiningerova, J. Krasensky, E. Havrdova, D. Horakova and T. Uher (2018). "Combining clinical and magnetic resonance imaging markers enhances prediction of 12-year employment status in multiple sclerosis patients." *J Neurol Sci* 388: 87-93. IF 1,593