



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

Roztroušená skleróza:

Klinické a paraklinické markery pro sledování aktivity nemoci

MUDr. Barbora Srpová

2020

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Neurovědy

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jan Laczó, Ph.D.

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

Školitel: doc. MUDr. Dana Horáková, 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 sNfL, 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 biomarkers and their potential benefit for routine clinical praxis. MRI data, clinical data and results of NfL measurements from 172 newly diagnosed patients with relapsing-remitting 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

Obsah:

1. Úvod	6
1.1. NfL	6
2. Cíle práce a hypotézy	7
2.1. Řeč	7
2.2. NfL	7
3. Materiál a metodika	8
3.1. Řeč	8
3.2. NfL	8
4. Výsledky	10
4.1. Řeč	10
4.2. NfL	11
5. Diskuse	12
6. Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz	15
6.1. Řeč	15
6.2. NfL	16
7. Použitá literatura	17
8. Seznam publikací	19
8.1. Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace	19
8.2. Publikace in extenso, které nejsou podkladem disertace	20

1. Úvod

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 současnosti jednou z nejdůležitějších oblastí výzkumu je detekce potenciálních markerů, které by umožnily přesnější diagnostiku, stanovení prognózy onemocnění, sledování aktivity nemoci a zhodnocení efektu terapie.

Markery (neboli přesněji biomarkery) u roztroušené sklerózy můžeme rozdělit do 2 hlavních skupin, a to na markery klinické a paraklinické. Tato práce se z klinických markerů věnuje parametrům řeči a z paraklinických markerů lehkým řetězcům neurofilament (NfL), a to především jejich sérovým hladinám (sNfL). Jelikož jsou sNfL považovány za jeden z nejslibnějších biomarkerů, je jim věnována majoritní část práce.

1.1. NfL

Neurofilamenta jsou proteinové polymery, které se řadí do kategorie intermediárních filament o velikosti 10nm a tvoří výraznou součást cytoskeletu neuronu, v němž plní především funkci strukturální. 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.

Velký potenciál NfL, jakožto biomarkeru u pacientů s RS, je již znám od roku 1998 (Fuchs and Cleveland 1998). 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). 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. ELISA metoda (Enzyme-Linked ImmunoSorbent

Assay), která se používá pro stanovení NfL v likvoru, není pro stanovení v séru, jež by bylo pro rutinní detekci nevhodnější, dostatečně citlivá. Ke změně došlo v roce 2015, kdy ke stanovení sNfL byla poprvé použita metoda Simoa (Single molecule array) (Gisslén et al. 2016). Jedná se o ultrasenzitivní imunochemickou metodu, jejíž podstatou je využití paramagnetických částic s navázanou protilátkou (Kuhle et al. 2016)

2. Cíle práce a hypotézy

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).

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).

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. Materiál a 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). Výsledky byly porovnány se 70 zdravými kontrolami spárovanými dle věku a pohlaví. Pacienti byli rozděleni do 3 skupin dle tíže disability v pyramidovém a mozečkovém funkčním podsystemu hodnotící škály EDSS (Expanded Disability Status Scale). Řeč pacientů byla pod dohledem specializovaného logopeda nahrávána při třech specifických řečových testech. 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. 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) (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

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). Jednalo se o pacienty po první demyelinizační atace dle tehdejších kritérií CIS (klinicky izolovaný syndrom), dle současných

revidovaných McDonaldových kritérií z roku 2017 pacienty již s klinicky definitivní RS.

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). Hladina NfL v likvoru byla měřena metodou ELISA za použití komerčně dostupných kitů NF-light UmanDiagnostics v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky I.LF UK a VFN v Praze. Sérové hladiny NfL byly měřeny pomocí platformy Simoa na univerzitním pracovišti v Basileji. (Disanto et al. 2017). U obou metod byla měření provedena na kódovaných vzorcích bez znalosti rezonančních či klinických dat pracovníky laboratoře (Srpova et al. 2020).

Za účelem posouzení vztahu mezi hematoencefalickou bariérou (HEB), NfL a zánětlivými markery CNS byly v likvoru a krvi zhodnoceny hladiny albuminu, imunoglobulinu G (IgG) a imunoglobulinu M (IgM). Průtokovou cytometrií byly stanoveny počty jednotlivých buněčných subtypů v likvoru (při stanovení byly použity protilátky proti antigenům, CD 80, CD8019, CD4, CCR5 a CXCR) a byl vypočten albuminový kvocient jakožto přímý marker integrity HEB (Uher, McComb, et al. 2020). K posouzení vztahu NfL s parametry lipidogramu byly využity hodnoty celkového cholesterolu, HDL cholesterolu, LDL cholesterolu a sérových apolipoproteinyů (ApoA-I, ApoA-II, ApoB a ApoE) (McComb et al. 2020).

V této studii byla analyzována 4letá rezonanční data. MR mozku byla vždy provedena ve stejném protokolu a na stejném přístroji na Neurologické klinice I.LF UK a VFN v Praze (Gyrosan 1,5T, Philips Medical Systems; Nizozemsko). Pacienti byli vyšetřeni v baseline (M0), v měsíci 12, 24, 36 a 48 (M12, M24, M36 a M48). Pomocí semi-automatické analýzy byly zhodnoceny parametry celkové i regionální atrofie (Srpova et al. 2020, Uher, Schaedelin, et al. 2020). Za účelem porovnání aktivity nemoci s hladinami sNfL byl využit koncept NEDA-3 (No Evidence of Disease Activity).

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).

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 korelací (Spearman $\rho = 0,93$; $p < 0,001$).

4. Výsledky

4.1. Řeč

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. 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.

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 ($r = 0,65$; $p < 0,001$). (Rusz et al. 2017).

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).

4.2. NfL

Byla prokázána silná korelace mezi sNfL a hladinami NfL v likvoru ($\rho=0,81$; $p<0,001$) (Srpova et al. 2019). Dále byla zjištěna silná korelace mezi veškerými časnými timepointy (screen, M0 a M1). Nejsilnější vztah byl pozorován mezi baselinovými hodnotami (M0) a hladinou sNfL v M1 ($\rho=0,93$; $p<0,001$) (Srpova et al. 2020).

V rámci posouzení vztahu sNfL s ostatními klinickými a rezonančními parametry byla v univariálních modelech prokázána nejsilnější asociace mezi relativní 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 ($p=0,036$). Nejsilnější multivariální model obsahoval absolutní změnu T1LV, změnu v počtu T2 lézí a čas od baseline (Srpova et al. 2020).

V rámci prediktivní analýzy jsme prokázali silný vztah mezi hladinou sNfL v M1 a rezonančními parametry (či jejich změnou) v M48. 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 hodnot 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 ($\rho=0,20$; $p=0,015$). Dále jsme prokázali lepší schopnost sNfL predikovat budoucí mozkovou atrofii v porovnání s baselinovou lezionální patologií (objem T1 a T2 lézí, počet T2 lézí a GAD lézí) (Srpova et al. 2020).

V sekci porovnání NfL s dalšími biochemickými parametry jsme se zaměřili na parametry lipidogramu. Nejdůležitějším zjištěním byl průkaz signifikantního vztahu (negativní závislosti) mezi oběma hladinami NfL (jak

v likvoru, tak v séru) a sérovou hladinou ApoA-II ($r_p = -0,28$, $p = 0,005$; $r_p = -0,32$, $p < 0,001$) (McComb et al. 2020). V rámci posouzení vlivu hematoencefalické bariéry na hladiny NfL jsme prokázali silnou asociaci mezi hladinami NfL (sérovými i likvorovými), albuminovým kvocientem ($r_p = 0,32$, $p < 0,001$; $r_p = 0,35$, $p < 0,001$) a likvorovým albuminem ($r_p = 0,31$, $p < 0,001$; $r_p = 0,40$, $p < 0,001$) (Uher, McComb, et al. 2020).

K posouzení schopnosti monitorace radiologické aktivity pomocí sNfL byla využita podskupina 163 pacientů, 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. Vzorok 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, jejichž hladiny sNfL byly pod 10. percentilem, měli přítomnou zcela minimální aktivitu na MR (76,6 % pacientů < 1 léze) (Uher, Schaedelin, et al. 2020).

Ke zhodnocení vztahu vývoje hladin sNfL a NEDA-3 statusu jsme se zaměřili na porovnání 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. Žádný z pacientů s NEDA-3 po celou dobu sledování neměl screeningové hladiny sNfL vyšší než 25 pg/ml (Srpova et al. 2020).

5. Diskuze

V části věnované řeči jsme v souladu s dřívějšími pracemi 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. 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). Z výsledků porovnání řečových abnormalit s neurologickým vyšetřením jsme identifikovali nejsilnější korelaci mezi funkcí horní končetiny (9HPT) a nepravidelnou orální diadochokinezou. V analýze řečových a rezonančních dat jsme prokázali signifikantní závislost mezi mozkovou atrofií a dvěma řečovými parametry (pomalou orální diadochokinezou jako markerem ataktické dysartrie a zpomalením tempa řeči jako markerem spastické dysartrie) (Rusz et al. 2017).

V části zabývající se NfL jsme se nejprve zaměřili na porovnání likvorových a sérových hladin NfL (Srpova 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).

Dalším krokem byla 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, 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). 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 prokázali schopnost sNfL predikovat budoucí mozkovou atrofiu (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

(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 nereflektuje probíhající atrofii, ale je prediktorem míry opoždění, budoucí atrofie.

V subanalýze jsme se 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.

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.

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. 90 % pacientů, kteří neměli přítomnou žádnou aktivitu na MR, měli hladiny sNfL nižší než 90. percentil. 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.

6. Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz

6.1. Řeč

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.

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 čistě 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

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 atrofií 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.

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. Použitá literatura

- Arrambide, G., C. Espejo, H. Eixarch, L. M. Villar, J. C. Alvarez-Cermenó, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Fuchs, Elaine, and Don W Cleveland. 1998. "A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease." *Science* 279 (5350):514-519.
- 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, 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.
- 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.
- 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/ccm-2015-1195.
- 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.
- Rusz, J., B. Benova, H. Ruzickova, M. Novotny, T. Tykalova, J. Hlavnicka, T. Uher, M. Vaneckova, M. Anelova, K. Novotna, L. Kadrozkova, 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., 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.
- 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.
- 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.
- 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., 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.

8. Seznam publikací

8.1. Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

Srpova, B., T. Uher, T. Hrciarova, C. Barro, M. Andelova, 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. 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. Anelova, K. Novotna, L. Kadrnozkova and D. Horakova (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. 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. IF 2,339

Friedova, L., J. Rusz, J. Motyl, B. Srpova, K. Vodehnalova, M. Anelova, 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

8.2. Publikace in extenso, které nejsou podkladem disertace

Preiningerova, J. L., Grishko, A., Sobisek, L., Anelova, 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

Anelova, 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. 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. IF 1,593