

Ľahké reťazce neurofilamentov a objemové parametre mozgu pri roztrúsenej skleróze

MUDr. Pavol Filippi¹
(neuroológia)

Spoluautori: MUDr. Veronika Vestenická, PhD.¹

Školiteľ: prof. MUDr. Peter Turčáni, PhD.¹

¹I. neurologická klinika LF UK a UNB, Bratislava

Úvod

Roztrúsená skleróza (RS) je chronická imunitne sprostredkovaná demyelinizačná choroba centrálného nervového systému (CNS). Pre RS je typická fokálna demyelinizácia nasledovaná neurodegeneráciou. Zápalové procesy sú dominantné v počiatocnom štádiu choroby, v ktorom sú však badateľné aj známky neurodegenerácie (01).

Pochopenie mechanizmov spôsobujúcich neurodegeneráciu je dôležité pri výbere terapie, ktorá by mohla tento proces ovplyvniť, a tým zabrániť progresii zdravotného postihnutia. Ostáva zatiaľ neznáme, či neurodegenerácia je sekundárna pri zápalových procesoch, alebo sa jedná o nezávislý proces v patogenéze RS.

Monitorovanie neuroaxonálneho poškodenia pri RS zastáva kľúčovú úlohu. A preto bolo potrebné hľadať biomarker vhodný k dlhodobému monitorovaniu choroby (02). Ľahké reťazce neurofilamentov (NfL) ako hlavné komponenty cytoskeletu axónov majú svoju funkciu v raste axónov, udržiavaní ich stability a sprostredkovaní intracelulárneho transportu molekúl pozdĺž axónov. Neuroaxonálne poškodenie vedie k uvoľneniu NfL do intersticiálneho priestoru, ďalej do likvoru a následne do periférnej krvi (03). NfL sa v periférnej krvi nachádzajú v sto násobne nižších hladinách ako v likvore.

Nedávno bola vyvinutá analytická metóda založená na protilátkach, Single-Molecule Array (SIMOA®), ktorá umožňuje vyšetriť NfL aj pri veľmi nízkych hladinách v pikogramoch na mililiter v sére, alebo plazme (www.quanterix.com).

Magnetická rezonancia (MR) je štandardné zobrazovacie vyšetrenie, používané pri diagnostike RS a monitorovaní progresie choroby. Na MR nález nových T2 lézií, zväčšovanie objemu už známych T2 lézií, či prítomnosť enhancujúcich lézií patrí medzi známky aktivity choroby. Objemové parametre mozgu, ktoré je MR vyšetrenie schopné poskytnúť, by mohli byť považované za markery neurodegenerácie, avšak uvedené vyšetrenie ešte nie je súčasťou rutínnej klinickej praxe. Úbytok mozgovej hmoty, ako makroskopický obraz neuroaxonálneho poškodenia, sa stal jedným z najdôležitejších ukazovateľov neurodegenerácie a progresie choroby (04). Na posúdenie objemových parametrov mozgu sa používa softvér pre MR, Icobrain, ktorý je rýchly, plne automatizovaný, presný, a využíva sa v klinickom výskume aj v rutínnej klinickej praxi (www.icobrain.com).

Cieľom našej práce bolo vyhodnotiť hladinu NfL v plazme (pNfL) u liečených pacientov s relaps remitujúcou formou RS (RRRS), porovnať hladiny so zdravými kontrolami a posúdiť úlohu pNfL ako potenciálneho biomarkera neurodegenerácie. Tiež sme chceli posúdiť vzťah medzi pNfL, demografickými údajmi, stavom postihnutia a objemovými údajmi z MR u liečených pacientov s RRRS.

Materiál a metódy

Do štúdie sme zaradili 56 pacientov s RRRS, na imunomodulačnej liečbe, ktorí sú dispenzarizovaní v centre pre RS na I. neurologickej klinike v Univerzitnej nemocnici Bratislava, Nemocnica Staré Mesto, a 36 zdravých kontrol, primeraných vekom a pohlavím. Sledovanie prebiehalo od mája 2018 do novembra 2018. Pacienti boli klinicky vyšetrení, a

bolo im stanovené skóre pomocou rozšírenej škály funkčného zneschopenia, Expanded Disability Stats Scale (EDSS).

Pred odberom pNfL a MR vyšetrením boli pacienti bez ataku minimálne šesť mesiacov. Exklúznym kritériom bola prítomnosť iného neurodegeneratívneho ochorenia, cerebrovaskulárne ochorenie a iné vážne interné diagnózy. Všetci pacienti podpísali informovaný súhlas a štúdia bola schválená etickou komisiou.

V jeden deň bola pacientom odobratá krv, boli klinicky vyšetrení a absolvovali MR vyšetrenie. Hladina pNfL bola vyšetrená na Neuroimunologickom ústave Slovenskej akadémie vied, metódou SIMOA.

MR vyšetrenie pacienti absolvovali na pracovisku Dr. Magnet, Kramáre, na 3-teslovom prístroji. MR nález bol vyhodnotený erudovaným rádiológom podľa štandardizovaného SM protokolu. Objemové parametre mozgu boli vyhodnotené softvérom Icobrain.

Z MR nálezov sme analyzovali viaceré parametre a to počet nových T2 lézií alebo zväčšenie známych T2 lézií a počet gadolínium enhancujúcich lézií. MR objemové parametre sme získali z nálezu vytvoreného softvérom Icobrain.

MR aktivitu sme zadefinovali ako prítomnosť aspoň dvoch nových T2 lézií alebo prítomnosť aspoň jedného gadolínium enhancujúceho ložiska.

Zo správy softvéru Icobrain sme získali údaje o objeme celého mozgu (Wbv), objeme sivej hmoty (Gmv), regionálne objemové zmeny bielej hmoty, objem FLAIR lézií, objem T1 lézií a objem enhancujúcich lézií. Objem celého mozgu a sivej hmoty bol v softvéru Icobrain automaticky korigovaný pre veľkosť hlavy, kde normálny rozsah a normatívne percentily zdravých kontrol zhodných vekom a pohlavím slúžia ako referenčné hodnoty. Atrofia objemu celého mozgu a sivej hmoty bola definovaná na základe odchýlky od referenčných hodnôt.

Dáta sme spracovali v štatistickom programe IBM SPSS verzia 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Na hodnotenie demografických, klinických a MR údajov sme použili metódy deskriptívnej štatistiky. Kategorické premenné sme vyjadrili v počtoch a percentách, numerické premenné u normálne distribuovaných dát na základe Kolmogorov-Smirnovho testu normality, ako aritmetický priemer a štandardnú odchýlku, v prípade nie normálnej distribúcie ako medián, IQR a rozsah. Pre porovnanie parametrických premenných v jednotlivých skupinách sme použili Studentov T-test, neparametrické premenné sme porovnávali pomocou Mann-Whitney U-testu. Neparametrická bivariačná korelačná analýza podľa Spearmana bola použitá pri určovaní vzťahu medzi hladinami pNfL, základnými charakteristikami súboru a MR parametrami. Štatistická signifikancia bola definovaná hodnotou $p < 0,05$.

Výsledky

Do štúdie bolo zaradených 38 žien (67.86%) a 18 mužov (32.14%) s priemerným vekom 41.43 rokov, v rozsahu 20 až 64 rokov. Trvanie dĺžky choroby bolo od 1 po 38 rokov, medián 9 rokov. Medián EDSS bol 3.25, v rozsahu 1 až 5.5. Kontrolná skupina pozostávala z 26 žien (72.2%) a 10 mužov (27.8%) s priemerným vekom 41.06 rokov, v rozsahu 24 až 67 rokov.

Priemerné hladiny pNfL u pacientov s RS sme namerali 14.73 ± 6.3 pg/ml, v rozsahu 6 až 34 pg/ml. Nenašli sme signifikantný rozdiel v hladine pNfL medzi mužmi a ženami 13.72 ± 6.5 pg/ml v porovnaní s 15.20 ± 6.3 pg/ml, $p = 0.43$.

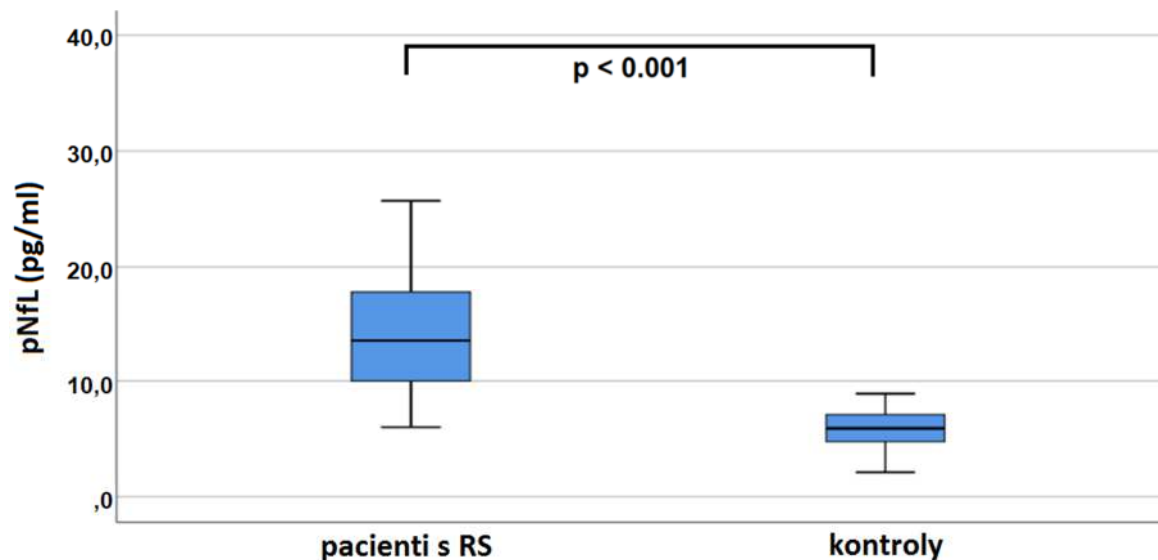
Nezistili sme signifikantný rozdiel medzi hladinami pNfL u pacientov s aktivitou na MR v porovnaní s pacientmi bez MR aktivity 17.02 ± 9.1 pg/ml v porovnaní s 13.81 ± 4.7 pg/ml, $p = 0.09$. Priemerný vek pacientov s aktivitou na MR bol signifikantne nižší v porovnaní s pacientmi bez MR aktivity 35.38 ± 7.4 rokov v porovnaní s 43.85 ± 11.5 rokov, $p = 0.009$.

Priemerné hladiny pNfL v kontrolnej skupine sme namerali 7.31 ± 3.7 pg/ml, v rozsahu 2.1 až 18.8 pg/ml. Taktiež sme nezaznamenali signifikantný rozdiel v pohlaví pre mužov a ženy 8.88 ± 4.6 pg/ml, v porovnaní so 6.70 ± 3.2 pg/ml, $p = 0.12$. U kontrol hladiny pNfL signifikantne korelovali s vekom, $p = <0.001$. Pri pacientoch s RS boli hladiny pNfL signifikantne vyššie v porovnaní s kontrolami 14.73 ± 6.3 pg/ml oproti 6.67 ± 3.9 pg/ml, $p <0.001$, Obrázok 1.

Hladiny pNfL v podskupine pacientov s Wbv atrofiou boli signifikantne vyššie v porovnaní s podskupinou pacientov bez Wbv atrofie 16.84 ± 6.8 oproti 13.02 ± 5.5 , $p = 0.025$. Podobne tiež hladiny pNfL v podskupine pacientov s Gmv atrofiou boli signifikantne vyššie ako hladiny u pacientov bez Gmv atrofie 17.65 ± 6.0 v porovnaní s 13.6 ± 6.0 , $p = 0.037$.

Štatisticky signifikantne pozitívne korelovala hladina pNfL s hodnotou EDSS $p = 0.004$, trvaním choroby $p = 0.026$, atrofiou Wbv $p = 0.017$ a atrofiou Gmv $p = 0.020$. Štatisticky signifikantne negatívne korelovala s Wbv $p = 0.044$. Nenašli sme signifikantnú koreláciu medzi pNfL a MR aktivitou, počtom nových T2 lézií a enhancujúcimi léziami.

Hodnota EDSS v podskupine pacientov s atrofiou Wbv bola signifikantne vyššia v porovnaní s podskupinou bez atrofie 3.78 ± 1.3 oproti 2.66 ± 1.3 , $p = 0.003$. Rovnako to bolo aj pri atrofi Gmv, kde hodnota EDSS bola signifikantne vyššia v porovnaní s podskupinou bez atrofie 4.13 ± 1.1 oproti 2.8 ± 1.3 , $p = 0.001$.



Obr.1: Hladiny pNfL u pacientov s RS a kontrol.

pNfL - plazmatická hladina ľahkých reťazcov neurofilamentov, RS - roztrúsená skleróza.

	pacienti s RS (n= 56)	Kontroly (n= 36)	p
Muži	18 (32.14%)	10 (27.8%)	NS
Ženy	38 (67.86%)	26 (72.2%)	NS
Vek (roky)	41.43 ± 11.15^a	41.06 ± 13.61^a	NS
Dĺžka choroby (roky)	9 (8.50, 1-38) ^b	NA	
EDSS	3.25 (2.50, 1-5.5) ^b	NA	
pNfL (pg/ml)	14.73 ± 6.38^a	7.31 ± 3.76^a	$p <0.001$ **
kategorické premenné sú vyjadrené ako číslo a percento (%), ^a: priemer \pm SD, ^b: medián, IQR a rozsah, NA: nehodnotené, NS: nesignifikantné, ** $p <0.01$.			

Tab.1: Základné charakteristiky súboru pacientov s RS a kontrol.

	n	Hodnoty	rho
Vek	56	41.43 ± 11.1 ^a	0.233
EDSS	56	3.25 (2.50, 1-5.5) ^b	0.377 **
Dĺžka choroby (roky)	56	9 (8.50, 1-38) ^b	0.298 *
Objem celého mozgu (Wbv)(ml)	56	1487 ± 91.5 ^a	-0.270 *
Objem sivej hmoty (Gmv)(ml)	56	896 ± 51.3 ^a	-0.222
Počet enhancujúcich lézií	56	0.00 (0.00, 0-4) ^b	0.082
Počet nových T2 lézií	56	0.00 (1.0, 0-18) ^b	0.157
Objem FLAIR lézií (ml)	56	9.38 (12.83, 0.6-28.7) ^b	0.191
Objem enhancujúcich lézií (ml)	40	0.00 (0.02, 0-2.06) ^b	0.054
Objem T1 lézií (ml)	52	6.11 (8.34, 0.09-24) ^b	0.194
Prítomná MR aktivita	16	28.6%	0.138
Neprítomná MR aktivita	40	71.4%	
Prítomná atrofia Wbv	25	44.6%	0.317 *
Neprítomná atrofia Wbv	31	55.4%	
Prítomná atrofia Gmv	15	26.8%	0.302 *
Neprítomná atrofia Gmv	41	73.2%	
kategorické premenné sú vyjadrené ako číslo a percento (%), ^a : priemer ± SD, ^b : medián, IQR a rozsah, rho: Spearmanov korelačný koeficient odvodený z bivariačnej korelačnej analýzy k hodnote pNfL, * p <0.05, ** p <0.01.			

Tab.2: Klinické a MR charakteristiky súboru pacientov a ich korelácia s pNfL.

Diskusia

RS je charakterizovaná zápalovými a neurodegeneratívnymi procesmi (05). Po dlhý čas bola považovaná za chronickú zápalovú chorobu bielej hmoty mozgu a miechy, ktorá vedie k demyelinizácii a nakoniec k neurodegenerácii. Posledných niekoľko rokov sa prehodnocovali patomechanizmy pri RS a predmetom záujmu boli neurodegeneratívne procesy, najmä sivej hmoty mozgu, ktoré sa javia ako nezávislé od demyelinizácie (06, 07).

V našej štúdii sme sa zamerali na použitie pNfL, ako na marker neuroaxonálneho poškodenia a prediktor mozgovej atrofie z periférnej krvi u pacientov s RS (08).

Prvý významný výsledok v našej práci je skutočnosť, že hladina pNfL u pacientov s RS je signifikantne vyššia v porovnaní s kontrolami. Hladina pNfL v súbore pacientov nekorelovala s vekom a nesúvisela ani s pohlavím. U kontrol hladina pNfL významne stúpala s vekom čo je v súlade s pozorovaním iných autorov (09).

Ďalším významným pozorovaním je pozitívna korelácia hladín pNfL s EDSS, o ktorej sa hovorí aj v niekoľkých publikovaných prácach (10). Podľa našich výsledkov, hladiny pNfL sú ovplyvnené rozsahom neurodegeneratívneho procesu a odrážajú klinickú závažnosť choroby.

Nezistili sme koreláciu medzi hladinou pNfL, počtom nových T2 a enhancujúcich lézií. Predpokladáme, že daný výsledok môže byť spôsobený skutočnosťou, že v sledovaní máme zaradených liečených pacientov, bez klinických prejavov aktivity choroby.

Zistili sme významne pozitívnu asociáciu hladín pNfL s atrofiou Wbv, atrofiu Gmv a inverznú asociáciu s Wbv, vyplývajúcu z prebiehajúceho procesu neurodegenerácie.

Naše zistenia naznačujú, že liečení pacienti s RS majú zvýšený úbytok mozgovej hmoty, ktorý koreluje so zvýšenou hladinou pNfL, čo je asociované so zhoršovaním EDSS. Z tohto hľadiska môžeme meranie hladiny pNfL považovať za biomarker neurodegenerácie podobne ako objemové parametre získané MR vyšetrením. Vďaka technológii SIMOA, ktorá umožnila stanoviť hladiny pNfL v periférnej krvi, sa môže vyšetrenie pNfL považovať za

dôležitý krok k jeho využitiu ako biomarkera v praxi. V porovnaní s MR vyšetrením je monitorovanie hladín pNfL časovo nenáročné, pre pacienta nezaťažujúce a finančne menej nákladné.

Podporené čiastočne grantom APVV-15-0228.

Zoznam použitej literatúry

01. Charil A, Filippi M. Inflammatory demyelination and neurodegeneration in early multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2007 Aug 15;259(1-2):7-15.
02. Disanto G, Barro C, Benkert P, et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2017 Jun;81(6):857-870.
03. Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2012 May;18(5):552-6.
04. Zivadinov R, Uher T, Hagemeyer J, et al. A serial 10-year follow-up study of brain atrophy and disability progression in RRMS patients. *Mult Scler.* 2016 Nov;22(13):1709-1718.
05. Giorgio A, De Stefano N. Effective Utilization of MRI in the Diagnosis and Management of Multiple Sclerosis. *Neurol Clin.* 2018 Feb;36(1):27-34.
06. Mandolesi G, Gentile A, Musella A, et al. Synaptopathy connects inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2015 Dec;11(12):711-24.
07. Filippi M, Preziosa P, Copetti M, et al. Gray matter damage predicts the accumulation of disability 13 years later in MS. *Neurology.* 2013 Nov 12;81(20):1759-67.
08. Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, et al. Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology.* 2019 Mar 5;92(10):e1007-e1015.
09. Khalil M, Pirpamer L, Hofer E, et al. Serum neurofilament light levels in normal aging and their association with morphologic brain changes. *Nat Commun.* 2020 Feb 10;11(1):812.
10. Kuhle J, Nourbakhsh B, Grant D, et al. Serum neurofilament is associated with progression of brain atrophy and disability in early MS. *Neurology.* 2017 Feb 28;88(9):826-831.