

**Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Neurovědy



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

MUDr. Petra Reková

Neurologické projevy Fabryho nemoci

Neurological manifestations of Fabry disease

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. David Kemlink, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci pracovala 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 dne 23.05.2023

Petra Reková

Poděkování

Celé své nejbližší rodině, za to, že mě vždycky podporovali. Manželovi a dětem, za neskonalou trpělivost, pochopení a oporu. Svým rodičům za celoživotní inspiraci a starostlivost. Svým sestrám a jejich rodinám za to, že mi vždycky držely palce.

Doc. MUDr. Davidu Kemlinkovi Ph.D., prof. MUDr. Aleši Linhartovi, DrSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, a také za čas, který mi věnovali.

Všem kolegům spoluautorům za pomoc s výzkumnými aktivitami.

Všem pacientkám, pacientům, zdravým dobrovolnicím a dobrovolníkům, kteří měli chuť účastnit se našich projektů

Identifikační záznam:

REKOVÁ, Petra. *Neurologické projevy Fabryho nemoci. [Neurological manifestations of Fabry disease]*. Praha, 2023. 154 s., 4 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Neurologická klinika. Školitel Kemlink, David

Abstrakt

Práce se zabývá cerebrovaskulárními projevy vzácného X-vázaného onemocnění, Fabryho choroby (FCh). Screeningové programy mohou odhalit nepoznané onemocnění, zvyšují povědomí o nemoci s cílem včasného stanovení diagnózy a zahájení terapie před rozvinutím ireverzibilního orgánového poškození. Identifikace vaskulárních abnormalit a vliv komorbidit na cerebrovaskulární fenotyp pacientů s FCh může pomoci rozšířit znalosti o patofyziologii cerebrovaskulárního postižení. Hlavními cíli studií, které jsou podkladem práce, bylo stanovit prevalenci FCh a zhodnotit relevanci diagnostiky FCh v rizikové skupině pacientů s akutním iktem, pomocí ultrazvuku analyzovat cerebrovaskulární fenotyp pacientů s FCh a určit prediktory výraznějšího cerebrovaskulárního postižení. V práci jsme ukázali relativně vysokou prevalenci FCh u dospělých pacientů s akutní CMP, navrhli překlasifikování varianty G325S a identifikovali novou variantu R30K. Upozornili jsme, že spojení aseptické meningitidy s lakunárním iktem u mladého člověka by mělo vést k podezření na FCh. Dále jsme demonstrovali vícečetné rozdíly v neurosonologických parametrech mezi pacienty s FCh a skupinou subjektů bez FCh. Potvrdili jsme častější výskyt strukturálních změn cévní stěny velkých tepen a zjistili nižší cerebrovaskulární reaktivitu arteria cerebri media u pacientů s FCh. Jako možný nový specifický fenotyp jsme detekovali vyšší variabilitu reaktivity mozkových cév v odpovědi na test zadržetí dechu. Prokázali jsme zvýšený pulzatilní index, který by mohl být odrazem zvýšené cévní rezistence a tuhosti cévního řečiště. Pozorované změny tak naznačují komplexní postižení cév. Jako významné prediktory těchto změn jsme v souboru nemocných s FCh identifikovali věk a celkovou tíži nemoci. Vliv hraje rovněž přítomnost klasických vaskulárních rizikových faktorů.

Klíčová slova: Fabryho choroba, cévní mozková příhoda, intimo-mediální šíře, vertebrální tepna, pulzatilní index, cerebrovaskulární reaktivita, léze bílé hmoty

Abstract

The presented thesis deals with cerebrovascular manifestations of a rare X-linked disease, Fabry disease (FD). Screening programs can detect unrecognized disease and increase awareness of the disease with the goal of early diagnosis and initiation of therapy before irreversible organ damage develops. Identifying vascular abnormalities and the influence of comorbidities on the cerebrovascular phenotype of FD patients may help promote knowledge of the pathophysiology of cerebrovascular involvement. The main objectives of the studies underlying this thesis were to determine the prevalence of FD and to evaluate the relevance of FD diagnosis in an at-risk group of patients with acute ischemic stroke, to analyse the cerebrovascular phenotype of patients with FD using ultrasound, and to identify predictors of significant cerebrovascular involvement. In this study, we showed a relatively high prevalence of FD in adult patients with acute stroke, proposed reclassifying the G325S variant, and identified a novel R30K variant. We noted that the combination of aseptic meningitis with lacunar stroke in a young person should lead to suspicion of FD. We further demonstrated multiple differences in neurosonological parameters between patients with FD and a control group of subjects without FD. We confirmed a higher incidence of structural changes in the vascular wall of large arteries and found lower cerebrovascular reactivity of the middle cerebral artery in patients with FD. As a possible new specific phenotype, we detected a higher variability of cerebral vascular reactivity in response to the breath-holding test. We demonstrated an increased pulsatile index, which could reflect increased vascular resistance and stiffness of the vasculature. Thus, the observed changes suggest complex vascular involvement. We identified age and overall disease severity as significant predictors of these changes in a cohort of FD patients. The presence of classical vascular risk factors might also play a role.

Keywords: Fabry disease, stroke, intima-media thickness, vertebral artery, pulsatility index, cerebrovascular reactivity, white matter lesions

Seznam zkratk:

ACC – arteria carotis communis

ACI – arteria carotis interna

ACM – arteria cerebri media

AV – arteria vertebralis

α -GAL A – alfa-galaktozidáza A

BHI – index zadržetí dechu, breath-holding index

BHIvar – variabilita indexu zadržetí dechu

BMI – body mass index, index tělesné hmotnosti

cIMT – intimo-mediální tloušťka v distální arteria carotis communis

CBF – cerebral blood flow, průtok krve mozkem

CMP – cévní mozková příhoda

ČNS JEP – Česká neurologická společnost Jana Evangelisty Purkyně

CNS – centrální nervový systém

CT – výpočetní tomografie

CVR – cerebrovaskulární reaktivita

CVRz – cerebrovaskulární rezistence

ČR – Česká republika

DM – diabetes mellitus

dVA – šíře vertebrální tepny v úseku V2

ERT – enzymová substituční terapie, enzyme replacement therapy

EKG – elektrokardiografie

FCh – Fabryho choroba

FLAIR – Fluid-attenuated inversion recovery

GLA – gen pro alfa-galaktozidázu A

lysoGb3 – globotriaosylsfinosin

MAP – střední arteriální tlak

MPRAGE – magnetization prepared acquisition gradient echoes

MRI – magnetická rezonance, magnetic resonance imaging

MSSI – Mainz Severity Score Index

NIHSS – National Institute of Health Stroke Scale

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Men

pCO₂ – parciální tlak kyslíčnicku uhličitého

PCR – polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

PI – pulzatilní index

TCCS – transkraniální barevně kódovaná sonografie, transcranial color-coded sonography

TIA – transitorní ischemická ataka

VFN – Všeobecná fakultní nemocnice

Vmb – průtoková rychlost v ACM za bazálních podmínek

WMAs – abnormality bílé hmoty, white matter abnormalities

Obsah

1. Úvod	11
1.1 Fabryho choroba	11
1.1.1 Definice a základní charakteristika nemoci	11
1.1.2 Historické poznámky	11
1.1.3 Epidemiologie	12
1.1.4 Biologický základ nemoci	13
1.1.5 Klinický obraz onemocnění	14
1.1.6 Možnosti terapie	21
1.2 Cerebrovaskulární problematika	24
1.2.1 Cévní zásobení mozku	24
1.2.2 Zobrazení mozkových tepen a vaskulárních změn CNS	28
2. Cíle práce a hypotézy	33
2.1 Tematické okruhy	33
2.2 Hypotézy a cíle	33
2.2.1 Práce 1: Stanovení prevalence Fabryho choroby u neselektovaných pacientů s akutní cévní mozkovou příhodou v České republice (1. tematický okruh)	33
2.2.2 Práce 2: Podrobné fenotypové charakteristiky GLA variant identifikovaných v rámci celostátního screeningu pacientů s cévní mozkovou příhodou v České republice (1. tematický okruh)	34
2.2.3 Práce 3: Cerebrovaskulární fenotyp u pacientů s Fabryho chorobou hodnocený pomocí ultrazvuku (2. tematický okruh)	35
2.2.4 Práce 4: Prediktory cerebrovaskulárních abnormit u pacientů s Fabryho chorobou	36
3. Metodika	37
3.1 První tematický okruh	37
3.1.1 Práce 1: Stanovení prevalence Fabryho choroby u neselektovaných pacientů s iktem v ČR	37
3.1.2 Práce 2: Podrobné fenotypové charakteristiky GLA variant identifikovaných v rámci celostátního screeningu pacientů s cévní mozkovou příhodou v České republice	41
3.2 Druhý tematický okruh	43
3.2.1 Práce 3: Cerebrovaskulární fenotyp u pacientů s Fabryho chorobou hodnocený pomocí ultrazvuku	43
3.2.2 Práce 4: Prediktory cerebrovaskulárních abnormit u pacientů s Fabryho chorobou	51
4. Výsledky	55

4.1	První tematický okruh	55
4.1.1	Stanovení prevalence Fabryho choroby u pacientů s akutní CMP v ČR. Podrobné fenotypové charakteristiky GLA variant identifikovaných v rámci celostátního screeningu pacientů s cévní mozkovou příhodou v ČR.....	55
4.2	Druhý tematický okruh.....	63
4.2.1	Cerebrovaskulární fenotyp u pacientů s Fabryho chorobou hodnocený pomocí ultrazvuku.....	63
4.2.2	Prediktory cerebrovaskulárních abnormit v kohortě pacientů s Fabryho chorobou.....	70
5.	Diskuze	75
5.1	První tematický okruh	75
5.1.1	Stanovení prevalence Fabryho choroby u pacientů s akutní CMP v ČR. Podrobné fenotypové charakteristiky GLA variant identifikovaných v rámci celostátního screeningu pacientů s cévní mozkovou příhodou v ČR.....	75
5.2	Druhý tematický okruh.....	81
5.2.1	Cerebrovaskulární fenotyp u pacientů s Fabryho chorobou. Prediktory cerebrovaskulárních abnormit v kohortě pacientů s Fabryho chorobou	81
5.3	Silné stránky a omezení	87
6.	Závěry, zhodnocení cílů a hypotéz	90
6.1	Práce č. 1. Stanovení prevalence Fabryho choroby u pacientů s iktem v ČR	90
6.2	Práce č. 2: Podrobné fenotypové charakteristiky GLA variant identifikovaných v rámci celostátního screeningu pacientů s cévní mozkovou příhodou v České republice	90
6.3	Práce č. 3: Cerebrovaskulární fenotyp u pacientů s Fabryho chorobou hodnocený pomocí ultrazvuku.....	91
6.4	Práce č. 4: Prediktory cerebrovaskulárního postižení hodnoceného pomocí ultrazvuku a magnetické rezonance u pacientů s Fabryho chorobou	91
7.	Souhrny.....	93
7.1	Souhrn a klinický význam	93
7.2	Summary and clinical implications	95
8.	Přehled literatury	97
9.	Seznam publikací.....	107
10.	Přílohy	109
10.1	Příloha 1.....	109
10.2	Příloha 2.....	121
10.3	Příloha 3.....	138
10.4	Příloha 4.....	154

1. Úvod

1.1 Fabryho choroba

1.1.1 Definice a základní charakteristika nemoci

Fabryho choroba (FCh, OMIM 30150), známá také pod názvy Anderson-Fabryho nemoc či Angiokeratoma corporis diffusum (Anderson, 1898; Fabry, 1898), je vzácné dědičné metabolické onemocnění s progresivním průběhem. Některé varianty genu GLA, lokalizovaném na chromozómu X, který kóduje enzym alfa-galaktosidázu A (α -GAL A nebo α -GAL A; EC 3.2.1.22) vedou ke snížené až zcela vymizelé aktivitě tohoto lyzozomálního enzymu. Důsledkem enzymové malfunkce je akumulace neutrálních glykosfingolipidů (zejména globotriaosylceramidu – Gb3, známý též jako ceramidtrihexosid) v lyzozomech buněk mnoha tělesných tkání a orgánů, včetně systému (Germain, 2010). Strádání substrátu iniciuje patofyziologické mechanismy, které se v konečném důsledku podílejí na klinických projevech onemocnění. Počáteční změna nukleotidové sekvence však ovlivňuje na biochemické, molekulární, organelové a buněčné úrovni řadu jiných fyziologických mechanismů (Živná et al., 2022), které se spolu s dalšími vlivy spolupodílejí a/nebo modifikují výsledný fenotyp nemoci. Prognosticky nejzávažnější je zejména postižení srdce, ledvin a CNS. Kvalita života je však výrazně ovlivněna rovněž výskytem periferních neurologických komplikací, projevů kožních a postižením smyslových orgánů (oční a vestibulokochlerání projevy).

1.1.2 Historické poznámky

FCh byla poprvé popsána na konci 19. století. V roce 1898 dva dermatologové, Angličan William Anderson (1842-1900) a Němec Johannes Fabry (1860-1930), nezávisle na sobě publikovali kazuistiky onemocnění u svých pacientů – mužů (Anderson, 1898; Fabry, 1898). Zezačátku byla pozornost věnována zejména kožním projevům nemoci, i když klinické projevy s postižením srdce, ledvin, bolestmi končetin a poruchami pocení byly rovněž popsány (Ruiter, 1939). V roce 1947 na základě výsledků posmrtného pozorování u dvou pacientů zemřelých na selhání ledvin Pompen vyslovil předpoklad, že se jedná o systémové strádavé onemocnění (Pompen et al., 1947). Významnými milníky se staly rok 1950 a 1967. Nejdříve bylo potvrzeno, že strádaný materiál je lipidové povahy (Sweeley a Klionsky, 1963), později byl určen defekt příslušného enzymu – ceramidtrihexosidázy, (Brady et al., 1967), dnes spíše

označovaného jako alfa-galaktozidáza A. Kompletní nukleotidová sekvence genu byla publikována v roce 1989 (Kornreich et al., 1989). Výzkum a vývoj specifických léčebných strategií byl umožněn vytvořením zvířecích modelů (knock out GLA gen u myši) (Ohshima et al., 1995). Specifická léčba pomocí intravenózně aplikované enzymové substituce byla pro pacienty s FCh schválena pro použití v běžné klinické praxi na počátku tohoto tisíciletí a v roce 2015 byl na trh uveden první perorálně podávaný chaperon.

1.1.3 Epidemiologie

FCh je řazena do skupiny lysozomálních střeďavých nemocí, která čítá přibližně 60 různých dědičných metabolických onemocnění (Ješina, 2019). Do nedávna byla FCh považována, po nemoci Gaucherově, za druhé nejčastěji se vyskytující lysozomální střeďavé onemocnění. Pravděpodobně se však jedná o vůbec nejčastější chorobu z této skupiny.

V době před érou rutinního genetického testování, kdy diagnóza FCh byla stanovována na základě klinické obrazu, biochemické analýzy (aktivita enzymu, analýza metabolitů) a rodinné anamnézy byla prevalence nemoci odhadována v rozmezí od 1:476 000 do 1:170 000, analýza dat z období 1970–1996 (Meikle et al.; Poorthuis et al., 1999). S rozvojem nejen biochemických technik, ale především genetické diagnostiky se ukázalo, že výskyt FCh v populaci může být vyšší. Zejména ženy, které byly dříve považovány za nepostižené přenašečky, popřípadě oligosymptomatické pacientky s normálním nebo mírným poklesem aktivity α -GAL A, nemusely být do starších prevalenčních výzkumů zahrnuty.

Technika měření aktivity α -GAL A v suché krevní kapce (Chamoles et al., 2001), technologický pokrok a dostupnost genetické analýzy spolu s uvedením specifické terapie na trh vedly ke zvýšení povědomí o nemoci. Ruku v ruce právě s dostupností specifické léčby se zvyšovalo také úsilí o co nevdčasnější diagnostiku onemocnění. Pozornost se obrátila k novorozeneckému screeningu nemoci či k testování rizikových populací. Novorozenecké screeniny (Spada et al., 2006; Lin et al., 2009) a vyšetřování specifických, pro FCh rizikových, populací pacientů (Rolfs et al., 2005; Brouns et al., 2010; Linthorst et al., 2010) již v prvních deseti letech nynějšího milénia ukázaly vyšší frekvenci variant genu GLA ukazující na možné dřívější podhodnocení výskytu FCh. Vyšší prevalence byla rovněž zaznamenána v ČR. Onemocnění bylo u

hemodialyzovaných pacientů zjištěno u 0,26 % mužů a 0,05 % žen (Merta et al., 2007) a diagnostikováno u 4 % mužů s nevysvětlitelnou hypertrofií levé komory (Palecek et al., 2014).

Dostupnost genetického vyšetření a nárůst testování novorozenců a pacientů z rizikových skupin v předchozím desetiletí - systematický přehled z roku 2018 (Doheny et al., 2018) v porovnání s rokem 2010 (Linthorst et al., 2010) uvádí 3,4x větší celkový počet testovaných pacientů - však s sebou nese rovněž vzestup počtu nalezených variant genu GLA, jejichž klinický význam není zcela jasný. Počet takových nalezených variant převyšuje patologické varianty způsobující onemocnění (Doheny et al., 2018). Vzhledem k tomu, že klinické projevy mohou být velmi rozmanité s nespecifickými příznaky a různě vyjádřenou závažností onemocnění, je velmi důležité tyto varianty správně interpretovat, zejména ty, které nebyly dříve popsány.

Obecně je výskyt variant rezultujících v klasický fenotyp odhadován v rozmezí od 1:25 000 do 1:40 000 (Desnick, 2014). Výskyt variant, které se klinicky manifestují v pozdějším věku a jejich fenotypové projevy jsou mono či oligosymptomatické (tzv. late-onset varianty) je až 10krát častější (Desnick, 2015).

1.1.4 Biologický základ nemoci

Příčinou FCh jsou patologické varianty genu GLA kódujícího lysozomální enzym α -GAL A. GLA gen je lokalizován na dlouhém raménku chromozómu X, v oblasti Xq22.1. Kódující oblast genu je tvořena 1290 páry bází a je rozdělena do 7 exonů. V současné době jsou známy stovky různých variant tohoto genu (McCafferty a Scott, 2019). Nejčastěji se vyskytují mutace bodové (missense, nonsense), vzácný však není ani výskyt delecí či insercí. Genovým produktem je polypeptid tvořený 429 aminokyselinami včetně N-terminální signální části čítající 31 aminokyselin. Pomocí rentgenové krystalografie byla aktivní struktura α -GAL A určena v roce 2004 Garmanem (Garman a Garboczi, 2004). Jedná se o homodimer, každý monomer sestává ze dvou domén, $(\beta/\alpha)_8$ doména, obsahující aktivní místo enzymu, a C-terminální doména, složená z osmi antiparalelních β listů. Správné prostorové uspořádání enzymu je nutné nejen pro dostatečnou aktivitu enzymu, ale také pro nenarušený průběh nitrobuněčného transportu α -GAL A a jeho následnou degradaci. Enzym je funkčně hydrolázou štěpící α -glykosidickou vazbu mezi terminální

galaktózou a laktosylceramidem (Guce et al., 2010) Důsledkem snížené či vymizelé aktivity enzymu je hromadění substrátu, v případě FCh zejména Gb3, v buňkách různých tkání a orgánů. Patofyziologické změny, které iniciuje akumulace nemetabolizovaného substrátu je považována za jeden z hlavních mechanismů nemoci. V poslední době se však ukazuje, že ke klinické manifestaci mohou přispívat rovněž další organelopatie, které mohou být odpovědí na přítomnost špatně sbaleného proteinu (Živná et al., 2022). Měřená aktivita enzymu může být snížena jen částečně, přesto může na mikroskopické úrovni docházet k rozvoji patologických procesů, které mohou přispět ke klinické manifestaci choroby.

1.1.5 Klinický obraz onemocnění

Obecně se rozeznávají dva základní fenotypy nemoci. Při klasickém (typickém) průběhu se onemocnění projevuje již v dětství nebo v období dospívání, nejčastěji pálivými bolestmi rukou a nohou, poruchami pocení, přítomností kožních angiokeratomů či některých očních nálezů (cornea verticillata, vinuté retinální cévy) (Germain, 2010). V pozdějších fázích života se objevují hlavní orgánové komplikace v podobě postižení ledvin, srdce a CNS.

Fenotypová manifestace FCh však může být i atypická. U atypických variant (varianty s pozdním začátkem, late-onset) FCh mohou některé z klasických příznaků onemocnění zcela chybět. Tyto varianty mívají pozdní začátek (čtvrtá až šestá dekáda) a často mono či oligosymptomatický průběh. Byla popsána kardiální nebo renální varianta onemocnění (Germain, 2010). První manifestací FCh může být i CMP (Sims et al., 2009), což jsme potvrdili v naší práci, jako uvádíme dále podrobně v experimentální části (Reková et al., 2021; Tomek et al., 2021). Onemocnění s pozdní manifestací bývá spojeno s reziduální aktivitou enzymu α -GAL A (Germain, 2010).

Dříve se předpokládalo, že ženy patologickými variantami GLA jsou klinicky asymptomatické a o onemocnění se hovořilo jako o X-recesivně vázaném. Ukázalo se však, že také heterozygotní ženy mohou mít klinické projevy nemoci. Tíže postižení u žen má výraznou klinickou variabilitu od asymptomatického průběhu až po těžké orgánové projevy nemoci srovnatelné s klasickým průběhem onemocnění u mužů. Za jeden z možných důvodů rozmanitosti klinických projevů FCh u žen je označován proces inaktivace X chromozómu v časných fázích embryogeneze a jeho případné

zešíkmení (skewed X-inactivation) upřednostňující inaktivaci mutované alely (Dobrovolny et al., 2005).

1.1.5.1 Manifestace nemoci mimo nervový systém

Mezi hlavní projevy mimo nervový systém patří postižení srdce, ledvin, kůže, očí, vestibulokochleárního systému. Pro kožní postižení jsou typické angiokeratomy. Nacházejí se zejména v oblasti mezi pupkem a koleny s maximem výskytu periumbilikálně a v oblasti genitálu. U pacientů se objevují již v dětství a jejich počet s věkem často narůstá.

U klasického průběhu onemocnění dochází u mužů ve věku kolem 20-30 let, u žen asi o deset let později, k postupnému zhoršování funkce ledvin. Prvním projevem je mikroalbuminurie, poté malá až středně velká proteinurie a současně klesá glomerulární filtrace. Pokud pacienti nejsou léčeni, pak v případě renálního postižení, bývá asi od třetí až čtvrté dekády života nutná dialyzační léčba a ev. transplantace ledvin.

Kardiální postižení je u pacientů s FCh velmi časté. Pro postižení srdce je charakteristická hypertrofie myokardu. Může jít o hypertrofii obou komor, ale i o pouhou hypertrofii septa. Již EKG vyšetření může upozornit na FCh. Nález na EKG křivce s výrazně navýšenou voltáží a v další fázi i změnami ST úseku se známkami zatížení levé komory, by mělo být indikací k echokardiografickému vyšetření. Kromě vysoké voltáže odrážející hypertrofii myokardu je typickou abnormitou zkrácení PQ intervalu (pod 120ms). Postupně dochází ke zpomalení atrioventrikulárního vedení vedoucí nezřídka až k nutnosti implantace kardiostimulátoru.

Zajímavým, častým a poměrně specifickým projevem jsou oční manifestace, jejichž přítomnost přispívá nejen k diagnostice, ale slouží rovněž jako marker závažnějšího průběhu onemocnění (Raizman et al., 2017). Z diagnostického hlediska je nejvíce přínosný průkaz přítomnosti cornea verticillata (výskyt u 44-95 % pacientů s FCh (Laney a Fernhoff, 2008). Jedná se o paprscitě se větvící opacity v povrchních vrstvách rohovky viditelné při vyšetření na šterbinové lampě. Cornea verticillata se dále vyskytuje pouze jako poléková (chronická medikace např. amiodaronem, chlorochinem, indometacinem, fenothiazinem, tamoxifenem aj.) (Raizman et al., 2017). Mezi další oční projevy patří například také Fabryho zadní subkapsulární katarakta nebo přítomnost vinutých retinálních cév, zvláště venul.

Vestibulokochlerání postižení je převážně zastoupeno vertigem a postupnou ztrátou sluchu. Vzácněji se objevuje úporný tinnitus.

1.1.5.2 Neurologické manifestace nemoci

Postižení periferního nervového systému

Nejčastějším a také mnohdy nejčasnějším projevem FCh jsou akrální (převážně) bolesti (obecně známý fakt, zkušenosti autorky). Přesný patofyziologický mechanismus vzniku bolesti u FCh není znám. Předpokládá se, že bolest je důsledkem postižení tenkých nervových vláken (neuropatická bolest), avšak nociceptivní komponenta je rovněž přítomna. Bolest bývá nejčastěji lokalizována do oblasti dlaní a prstů, plant či lýtek, mohou být však postiženy také jiné části těla. Například bolesti kloubů jsou referovány až v 27,2 % mužů a 24,1 % žen s FCh (Politei et al., 2016). Pacienti charakterizují bolest nejčastěji jako pálivou, bodavou, bolestivý chlad. Epizodické bolestivé ataky či krátkodobé zhoršení chronické bolesti je popisováno u 70 % mužů a 52 % žen, chronická bolest pak obtěžuje asi 50 % mužů a 33 % žen s FCh. Specifickou situací, charakteristickou pro pacienty s klasickým průběhem FCh, jsou tzv. krize. Jde o hodiny až dny trvající bolestivé záchvaty, které začínají většinou akrálně a rozšiřují se do celého těla. Krize pacienty velmi vyčerpávají, bolesti jsou kruté, nesnesitelné, agonizující. Ataky bolestí či zhoršení chronických obtíží jsou často spouštěny interkurentním onemocněním, stresem, změnou venkovní teploty, tělesnou aktivitou (zkušenosti autorky, (Politei et al., 2016). Bolesti výrazně snižují kvalitu života pacientů s FCh (Burand a Stucky, 2021).

Projevy postižení autonomního nervového systému

Nejčastějšími klinickými projevy, na kterých se spolupodílí postižení autonomního nervstva, jsou projevy gastrointestinální a poruchy pocení. Gastrointestinální obtíže jsou u pacientů s FCh velmi časté, postihují až 50 % žen a téměř 60 % pacientů-mužů. (Caputo et al., 2021). Kromě bolestí břicha nemocní trpí nadýmáním, průjmy či naopak úpornou zácpou, nauzeou, někdy i opakovaným zvracením. Hypohidrosa či anhidrosa jsou jiným příkladem spojeným s postižením autonomního nervového systému (Lidove et al., 2006). V důsledku snížené schopnosti pocení pacienti špatně tolerují vyšší teploty či fyzickou zátěž. V literatuře byly popsány i další projevy autonomní dysregulace, například poruchy pupilární konstriktce, snížení tvorby slz, slin, dysregulace krevního tlaku vedoucí k ortostatickým hypotenzím (Reková, 2018).

Postižení cerebrovaskulární reaktivity se může spolupodílet na zvýšené četnosti mozkových příhod u pacientů s FCh.

Postižení centrálního nervového systému:

Hlavní klinické projevy z oblasti CNS ukazuje tabulka 1.

CMP a TIA jsou nejčastějším projevem cerebrovaskulárního postižení u pacientů s FCh. Vedle postižení srdce a ledvin patří CMP a TIA mezi prognosticky nejzávažnější a mohou být dokonce první klinickou manifestací nemoci (Sims et al., 2009), (Tomek et al., 2021) Retrospektivní studie čítající menší počty pacientů s FCh uvádí frekvenci výskytu iktů, ať už klinicky manifestních příhod či nálezů němých ischemií při zobrazení CNS, v širokém rozmezí (7 %-48 %) (Gupta et al., 2005; Vedder et al., 2007). Vzhledem k malému počtu pacientů trpících FCh jsou anonymní data z celého světa shromažďována v registrech (Fabry Registry, Fabry Outcome Survey, FollowMe Pathfinders Registry), které jsou zdrojem informací nejen o přirozeném průběhu nemoci a klinických projevech, ale také o účinnosti léčby u pacientů. Údaje z registrů potvrzují častý výskyt mozkových příhod u nemocných s Fabryho chorobou (Sims et al., 2009). Data z Fabry Registry ukazují, že většina pacientů prodělala první iktus ve věku mezi 20 a 50 lety, přičemž 22 % pacientů v době první příhody bylo mladších 30 let. Navíc CMP se objevila u velkého procenta pacientů (50 % mužů a 38 % žen) ještě před stanovením diagnózy FCh (Sims et al., 2009). Patofyziologie vzniku CMP/TIA u pacientů s FCh není přesně objasněna. Vaskulární postižení (viz dále) však hraje důležitou roli ve vzniku CMP.

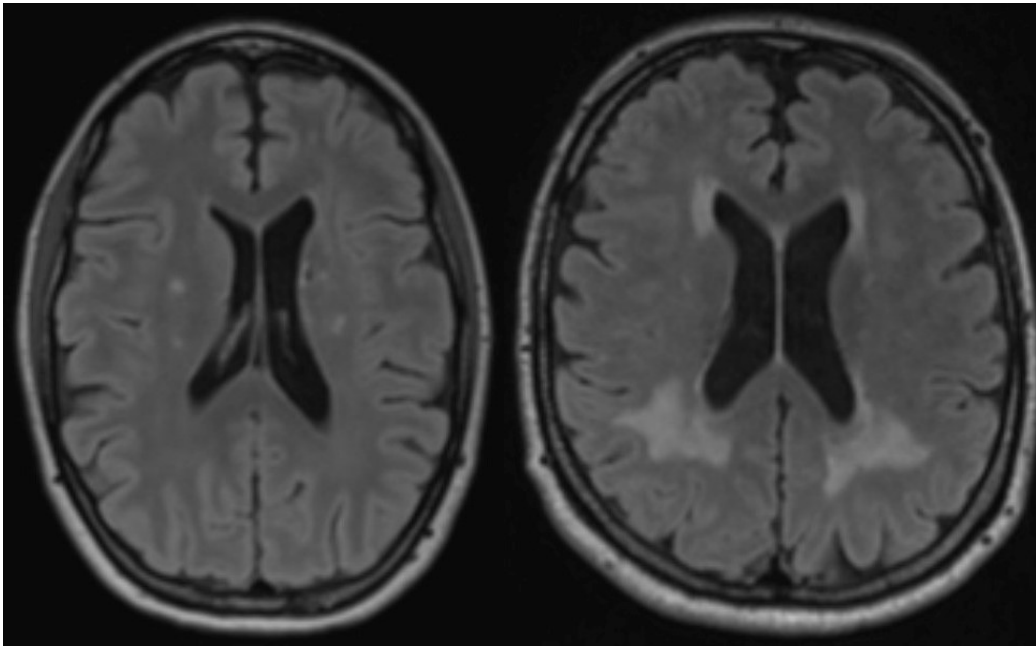
Vzácnějším projevem FCh, který se může vyskytnout ve spojení s recidivujícími mozkovými příhodami, je aseptická meningitida, jejíž výskyt byl v literatuře u pacientů s FCh opakovaně popsán a potvrzují ho rovněž zkušenosti autorky. Klinicky přítomné bolesti hlavy ve spojení s fokálními neurologickými příznaky jsou doprovázeny patologickým likvorologickým nálezem ve smyslu lehké až střední pleiocytózy (do 100 buněk v 1 μ l).

Při vyšetření magnetickou rezonancí lze identifikovat u pacientů s FCh některé častěji se vyskytující abnormality. Makroangiopatické změny zahrnují dilatace, elongace a tortuozity tepen jak v karotické, tak ve vertebrobazilární oblasti. Rozšíření bazilární tepny může upozornit na možnou FCh (Fellgiebel et al., 2011).

Nález na MRI mozku u pacientů s FCh vykazují typické charakteristiky onemocnění malých tepen, jako jsou lakunární infarkty (Reková et al., 2021), hyperintenzity bílé hmoty nejlépe viditelné v T2 vážených obrazech či ve FLAIR sekvencích (Körver et al., 2018) či mikrohemoragie (Reisin et al., 2011). WMAs postihují subkortikální, hluboké i periventrikulární oblasti bílé hmoty. Mohou být tečkovité, vícečetné i splývající (obrázek 1). Práce, které hodnotily, ať už pomocí škál klasických numerických škál např. Fazekasovy škály (Fazekas et al., 1987) či volumetricky, přítomnost a rozsah postižení bílé hmoty (hyperintenzity na T2W) na MRI mozku u pacientů s FCh ukázaly, že abnormality jsou detekovatelné již v časném věku, dokonce i u dětí. (Cabrera-Salazar et al., 2005), mají progresivní charakter, distribuce je typická pro onemocnění malých tepen CNS (Crutchfield et al., 1998), tíže postižení je podobná u mužů i symptomatických žen (Fellgiebel et al., 2005), jejich přítomnost může předcházet klinické neurologické projevy nemoci (Rost et al., 2016a). Patogeneze WMAs není zcela objasněna, roli hrají vaskulární změny, předpokládá se však, že na jejich vzniku se podílejí ještě jiné patofyziologické mechanismy než pouze vaskulárně-ischemické. Léze v oblasti bílé hmoty mohou někdy napodobovat nález u roztroušené sklerózy. Na rozdíl od roztroušené sklerózy se však WMAs jen zřídka vyskytují v oblasti corpus callosum (Cocozza et al., 2017), nemívají enhancement a, pokud je autorům známo, také spinální lokalizace nebyla dosud popsána.

Tabulka 1: Hlavní klinické projevy Fabryho nemoci z oblasti centrálního nervového systému

Cerebrovaskulární	Neuro- psychiatrické	Otoneurologické	Ostatní (vzácnější)
<ul style="list-style-type: none"> • TIA, CMP • abnormality při zobrazení CNS • vaskulopatie <ul style="list-style-type: none"> - velké tepny (dilatace, elongace, tortuosity) - malé tepny (včetně němých infarktů) • postižení bílé hmoty 	<ul style="list-style-type: none"> • změny nálady <ul style="list-style-type: none"> - deprese • změny v chování • kognitivní deficit až demence (zřídka) 	<ul style="list-style-type: none"> • tinnitus • poruchy sluchu • vertigo 	<ul style="list-style-type: none"> • aseptická meningitida • formy napodobující roztroušenou sklerózu
<p>Vysvětlivky: TIA = transitorní ischemická ataka; CMP = cévní mozková příhoda; CNS = centrální nervový systém</p>			



Obrázek 1: Léze v oblasti bílé hmoty u pacientů s Fabryho chorobou, MRI mozku, axiální řezy, FLAIR sekvence. 33letá pacientka, tečkovité hyperintenzity (vlevo) a 48letý pacient, splývavé hyperintenzity (vpravo).

Vaskulární postižení

Akumulace Gb3 v endotelu cév a v buňkách hladké svaloviny cév je typické pro FCh. Přesné patofyziologické mechanismy, které vedou ke strukturálnímu a funkčnímu postižení tepen u pacientů s FCh však nejsou zcela objasněny.

U pacientů s FCh, například rozšíření intimo-medie velkých a středních tepen (Barbey et al., 2006a; Kalliokoski et al., 2006), abnormality tepenné vazodilatace vyvolané zvýšeným krevním průtokem (flow mediated dilation) (Kalliokoski et al., 2006), postižení cerebrovaskulární reaktivity (Moore et al., 2002a) či remodelace stěn přívodných mozkových tepen vedoucí k jejich tortuozitám a dilatacím (Manara et al., 2017). Cévní postižení se rovněž podílí na vzniku abnormalit bílé hmoty mozku často nacházených při zobrazení pomocí MRI (Rost et al., 2016a).

1.1.5.3 Biomarkery nemoci

V roce 2008 deacylovaná forma Gb3, lysoGb3, byl objeven jako biomarker FCh. (Aerts et al., 2008). Plazmatické hladiny lysoGb3 silně korelují s fenotypem nemoci, vyšší hladiny mají pacienti s klasickým fenotypem, u pacientů s pozdním začátkem onemocnění jsou hladiny nižší.

1.1.6 Možnosti terapie

Léčebné strategie u pacientů s FCh zahrnují postupy specifické i nespecifické (Tabulka 2) Mezi specifickou terapií řadíme léčbu pomocí ERT, která je v ČR k dispozici od roku 2004 a terapii pomocí molekulárního chaperonu – migalastatu.

ERT spočívá v dodávání uměle vyrobeného enzymu pacientům. K dispozici jsou dva preparáty – agalsidáza α (Replagal, Takeda) a agalsidáza β (Fabrazym, Sanofi Genzyme). Léky jsou podávány pacientům v infuzi trvající 120–180 min 1× za 14 dní. Přestože klinické studie prokázaly, že během léčby dochází ke redukci nálože akumulovaného Gb3 ve tkáních a ke snížení plazmatického biomarkeru nemoci lysoGb3 (Eng et al., 2001; Schiffmann et al., 2001; van Breemen et al., 2011), dlouhodobá efektivita je individuální, důležité je včasné zahájení terapie, léčba je účinnější, pokud se zahájí před rozvinutím ireverzibilních orgánových změn (Arends et al., 2017). Nicméně přesné načasování zahájení léčby je nejasné, protože nemáme v tomto ohledu k dispozici žádné randomizované kontrolované studie. U části pacientů bylo potvrzeno zpomalení zhoršování renálních funkcí, zpomalení progresu hypertrofie myokardu, snížení kardiovaskulárních komplikací a zlepšení kvality života (Eng et al., 2001; Schiffmann et al., 2001; Thurberg et al., 2004; Banikazemi et al., 2007; Ortiz et al., 2016). Enzymová substituční terapie může zmírnit intenzitu bolestí u pacientů s FCh a snížit spotřebu analgetické terapie, zlepšit percepci tepelných a vibračních podnětů (Politei et al., 2016).

Od roku 2015 je v ČR schválen lék migalastat, perorálně podávaný chaperon. Chaperony jsou malé molekuly, které vazbou na endogenní (ale i exogenně dodávaný) enzym jeho strukturu stabilizují (cílem je zlepšit správné skládání mutovaného proteinu) a zvyšují jeho účinnost. Migalastat je vhodný jen pro některé nemocné s určitými variantami genu, kdy produkována endogenní α -GAL A je nestabilní.

Specifická terapie pomocí ERT a chaperonů bude možná v brzké době rozšířena o další možnosti. Ve fázi testování je druhá generace ERT, Pegunigalsidaza α (Protalix

Biotherapeutics, Izrael) a moss-aGAL (Greenovation biopharmaceuticals, Německo). Také cílená terapie zaměřená na redukci substrátu je nyní již ve fázích klinického zkoušení (např. blokátor glukosylceramid-syntázy, lucerastat (Idorsia Pharmaceuticals, Švýcarsko) či venglustat (Sanofi Genzyme). Rovněž genová terapie FCh vzbuzuje naděje. Je testován přenos genetické informace pomocí lentivirových vektorů s následnou tvorbou enzymu v modifikovaných CD34+ hematopoetických buňkách (van der Veen et al., 2020).

Zahájení a případné ukončení cílené specifické léčby FCh se v zásadě řídí doporučením evropské skupiny odborníků. O nasazení léčby rozhoduje typ postižení (varianty), kdy u klasických forem choroby je třeba léčbu indikovat při známkách prvních závažných symptomů a známek orgánového postižení ve vztahu k nemoci (konkrétně u neurologických projevů většinou indikujeme léčbu při výskytu neuropatické bolesti, TIA či CMP; může být rovněž zvažena u postižení bílé hmoty CNS). Naopak léčba není doporučena u pokročilých forem postižení a u nemocných s limitovanou prognózou (Biegstraaten et al., 2015). Problematická je stále situace u nemocných s pozdními formami, tedy především s izolovanou kardiální manifestací. Léčba je na místě u pacientů se známkami hypertrofie a remodelace levé komory, s poruchami rytmu či s projevy srdečního selhání. V současné době ale probíhá řada projektů, které mají za cíl prokázat, že i u těchto nemocných je časné nasazení terapie přínosné.

Významnou roli v terapii pacientů s FCh hrají i nespecifické léčebné postupy. Příkladem může být chorobu ovlivňující léčba (např. použití inhibitorů angiotenzin konvertujícího enzymu a sartanů v terapii proteinurie, primární a sekundární prevence CMP) či léčba symptomatická, která zahrnuje např. medikamentózní ovlivnění neuropatických bolestí. V komplexním terapeutickém přístupu je však velmi důležitá i podpůrná nefarmakologická léčba, jako je úprava stravovacího režimu u pacientů s gastrointestinálními projevy, minimalizace spouštěčů bolestivých atak (rychlá terapie horečky a infekcí, přiměřená fyzická aktivita, používání klimatizace, udržování adekvátní hydratace apod.), a v neposlední řadě psychologická podpora pacientů.

Tabulka 2: Přehled léčebných možností hlavních orgánových projevů – příklady

Specifická léčba		Nespecifická léčba	
		Farmakologická	Nefarmakologická
Nervový systém	<ul style="list-style-type: none"> • enzym-substituční • chaperony • genetická terapie* • substrát redukční* 	<ul style="list-style-type: none"> • neuropatická bolest <ul style="list-style-type: none"> - např. gabapentin, pregabalin, analgetika • primární a sekundární prevence iCMP <ul style="list-style-type: none"> - např. protidestičková terapie, antikoagulační léčba aj. 	<ul style="list-style-type: none"> • minimalizace spoušťových faktorů • adekvátní hydratace • tepelný komfort
Srdce		<ul style="list-style-type: none"> • farmakoterapie srdečního selhání • léčba arytmií 	<ul style="list-style-type: none"> • kardiostimulace • implantabilní defibrilátor • revaskularizace • transplantace srdce
Ledviny		<ul style="list-style-type: none"> • ovlivnění proteinurie <ul style="list-style-type: none"> • např. ACE inhibitory, sartany 	<ul style="list-style-type: none"> • dialýza • transplantace ledvin

Vysvětlivky: * budoucí léčba

ACE inhibitory = angiotensin converting enzyme inhibitor, inhibitory enzymu aniotenzin-konvertázy, iCMP = ischemická cévní mozková příhoda

1.2 Cerebrovaskulární problematika

1.2.1 Cévní zásobení mozku

1.2.1.1 Poznámky k energetickému metabolismu mozku

Mozek je vysoce energeticky náročný orgán. Přestože jeho hmotnost tvoří asi 2 % celkové tělesné hmotnosti, spotřebovává asi 20% celkové spotřeby kyslíku a asi 25 % celkové spotřeby glukózy. Vysoká spotřeba kyslíku a glukózy jde zejména na vrub udržení membránového potenciálu prostřednictvím $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPázy}$. Pro udržení řádného funkčního stavu membrán a správných pochodů na úrovni buněk a buněčných organel je zásadní adekvátní krevního zásobení mozku prostřednictvím jeho vaskulárního systému.

1.2.1.2 Anatomie mozkového cévního zásobení

Tepny zásobující mozek lze z praktického hlediska (zejména z pohledu zobrazení mozkových tepen – diskutovaného podrobněji dále v textu) dělit na extrakraniální a intrakraniální.

Extrakraniální mozkové tepny zahrnují všechny tepny a jejich segmenty přivádějící krev ze srdce pod bázi lebeční (Bar, 2003). Intrakraniální část tepenného řečiště zahrnuje tzv. přední mozkovou cirkulaci, kterou tvoří postupně větvcí se tepny z odstupující z karotických tepen (karotické povodí) a tzv. zadní mozkovou cirkulaci, jež je konstituována z cév navazujících na extrakraniální úsek aa. vebrales (vertebrobazilární povodí). Hlavní tepenné kmeny předního a zadního povodí jsou propojeny do tzv. Willisova okruhu. Z hlavních intrakraniálních tepenných kmenů pak postupně odstupují tepny menší, superficiální tepny a hluboké perforující arterie. Velké tepny (extrakraniální a hlavní intrakraniální kmeny) a malé tepny mají rozdílné strukturální i funkční charakteristiky, které se mohou i odlišně uplatňovat v rámci patofyziologických schémat u patologických stavů a nemocí.

1.2.1.3 Anatomie a histologie arteriální stěny, mozková mikrocirkulace

Extrakraniální tepny (ACC, ACI) a hlavní mozkové kmeny (například ACM) mají třívrstvou strukturu stěny, skládají se z tunica intima, tunica media a z adventicie. Intrakraniální tepny mají na rozdíl od tepen extrakraniálních tenčí adventicii s menším počtem elastických vláken i tenčí tunica media. Malé tepny, arterioly, odstupující z hlavních tepenných kmenů (hluboké perforující arterie) či z kortikálních větví

hlavních mozkových tepen (dřeňové perforující tepny) jsou v podstatě konečnými tepnami s minimem anastomóz. Malé arterie a arterioly jsou rezistentní cévy a jsou odpovědné za periferní cévní odpor, cerebrovaskulární rezistenci. Parenchymové arterioly (cévy o průměru 30 μm a menší, tloušťka cévní stěny 6 μm) spolu s kapilárním systémem (průměr kapilár je 8 μm , šíře stěny 0,5 μm) a venulami (průměr lumina 20 μm a tloušťka stěny 1 μm) tvoří hlavní části mozkové mikrocirkulace, která je odpovědná za výměnu krevní plynů a nutrientů (Chandra et al., 2017).

1.2.1.4 Vazoreaktivita mozkových tepen, kontrola mozkového krevního průtoku

Cerebrální vazoreaktivita je fyziologický mechanismus, schopnost mozkových tepen reagovat na vazoaktivní impulzy konstrikcí či dilatací. Cílem je udržet dostatečný krevní průtok (CBF). Dostatečný průtok krve mozkem, jehož hnací silou je cerebrální perfúzní tlak (CPP), je nutný pro adekvátní oxygenaci nervových buněk, přísun glukózy a odsun metabolitů. CBF je nepřímo úměrný cerebrovaskulární rezistenci. Krevní průtok mozkem můžeme vyjádřit vztahem $CBF = CPP/CVRz$. CPP je rozdíl mezi MAP a tlakem v žilním řečišti, resp. intrakraniálním tlakem (ICP). $CPP = MAP - ICP$. V situaci, kdy je ICP stabilní, můžeme CPP odhadnout z MAP. A tedy, pokud $CBF = (MAP - ICP)/CVRz$, v případě stabilního intrakraniálního tlaku je $CBF = MAP/CVRz$.

Dostatečný krevní průtok je zajištěn několika základními mechanismy. Mechanismem cerebrální autoregulace a chemicko-metabolickou regulací (hlavní roli hraje $p\text{CO}_2$ a dále pak spřažení a souhra buněk nervového systému s blízkými cévami v souvislosti s jejich funkčním stavem – tzv. neurovaskulární couplingem). Doplněním k výše jmenovaným základním mechanismům je neurogení regulace krevního toku. Celý systém pak působí ve vzájemné souhře a je velmi komplexní a dosud ne zcela dobře prozkoumaný.

1.2.1.5 Regulační mechanismy krevního průtoku mozkem

Cerebrální autoregulace

Autoregulace je fyziologická schopnost cév orgánu udržet stabilní krevní průtok při změnách perfúzního tlaku.

Jako mozkovou autoregulaci v užším slova smyslu označujeme vnitřní schopnost tepenného řečiště mozku udržet adekvátní stabilní mozkovou perfúzi navzdory

výkyvům krevního tlaku (respektive přesněji CPP). Za fyziologického stavu je autoregulace zajištěna myogenní kontrolou cévního tonu, tj. děje změnou tonu arterií, která vede ke změně CVRz.

V rozmezí MAP 60-150 mmHg (8-20 kPa) je u normotenzního jedince mozkový průtok konstantní. Se změnou středního arteriálního tlaku dochází ke změně průsvitu tepének ve smyslu vazokonstrikce či vazodilatace, což vede k udržení stabilního krevního průtoku. Konkrétně vzestup MAP vede k vazokonstrikci, s poklesem MAP dochází na úrovni tepenného řečiště k vazodilataci. Uvedené limity platí pro normotenzní jedince. U pacientů s hypertenzí je autoregulační oblast posunuta doprava, u hypotenzních naopak doleva.

Myogenní kontrola je zajištěna vnitřní vlastností hladkých svalových buněk cévy, což bylo poprvé v pokusech in-vitro demonstrováno počátkem 80. let minulého století (Vinall a Simeone, 1981). Tlakem indukované protažení buněk hladkého svalstva vede k depolarizaci membrány hladkých svalových buněk za účasti mechanosenzitivních kationtových kanálů (TRPC6 a TRPM4) (Earley et al., 2004). Depolarizace membrány vede k vzestupu Ca^{2+} do buňky skrze napěťově řízené vápníkové kanály. Zároveň dochází k uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula buněk. Výsledkem řetězce reakcí je vazokonstrikce.

In vitro, na izolované arteriole z krysího mozku, bylo demonstrováno, že myogenní reakce tonu tepének (ve smyslu vazokonstrikce a vazodilatace) je odrazem jak změn intraluminálního tlaku, tak průtoku uvnitř cévy, a to nezávisle na sobě. Autoři demonstrovali, že vzestup intraluminálního tlaku z 20 mmHg na 100 mmHg při nulovém průtoku je provázeno vasokonstrikcí. Vasokonstrikce je maximální při 60 mm Hg. Pokud v tepně je udržován konstantní tlak 60 mmHg je nízký průtok provázen vazodilatací, zvýšení průtoku pak vazokonstrikcí (Ngai a Winn, 1995).

V podmínkách živého organismu nelze od sebe oddělit změny tlaku a průtoku uvnitř cévy. Změny v krevním průtoku vedle odpovědi hladkých svalových buněk na změny intraluminálního tlaku přispívají k myogenní odpovědi.

Chemicko-metabolická kontrola krevního průtoku mozkem:

Vliv krevních plynů

Parciální tlak kyslíčnicku uhličitého v krvi a průtok krve mozkem. Hematoencefalická bariéra je volně propustná pro CO₂, rovnováha mezi pCO₂ krve a pCO₂ v extracelulárním prostoru mozku se vytváří rychle. Tepny mozku reagují velmi citlivě na zvýšení parciálního tlaku kyslíčnicku uhličitého v krvi (paCO₂), které vede k jejich dilataci. Snížením cévní rezistence v důsledku rozšíření arteriol dochází ke zvýšení CBF a naopak. Jeho velikost pak závisí na arteriálním pCO₂. Například inhalace 7 % CO₂ ve vzduchu vyvolá u mladého člověka více než 100% vzestup krevního toku (Kalvach, 2010). Změny cévního tonu v důsledku změn arteriálního pCO₂ se dějí v rozmezí 2,7-9,3 kPa (Peisker et al.). Mimo toto rozmezí jsou cévy v maximální dilataci či konstrikcii a další změny tonu již nejsou možné.

Reaktivitu mozkových tepen na změnu arteriálního pCO₂ dokládá řada prací, ať již využívají ke zvýšení paCO₂ inhalaci vzduchu obohaceného CO₂ či metody zadržetí dechu. Změny CBF v hlavních kmenech mozkových tepen v odpovědi na zvýšení pCO₂ lze hodnotit pomocí transkraniální dopplerovské sonografie (Ide et al., 2007; Battisti-Charbonney et al., 2011). Na změny pCO₂ jsou citlivé jak velké tepny (vnitřní karotidy, vertebrální arterie, hlavní kmene mozkových tepen) tak piální a parenchymové arterioly (Willie et al., 2014). Zdá se, že více než samotné CO₂ hrají roli H⁺ a snížení extracelulárního pH (Kontos et al., 1977). Acidóza svým modulujícím efektem na Ca²⁺ signalizaci svalových buňky cévní stěny a jejím prostřednictvím na vysokovodivostní Ca²⁺ ovládané K⁺ kanály (BKCa) způsobuje snížení tonu cerebrálních arteriol (Dabertrand et al., 2012).

Funkční hyperémie (neurovaskulární vazba, neurovaskulární coupling)

Neurovaskulární vazba je časové spřažení mezi zvýšením neuronální aktivity a regionálním zvýšením krevního průtoku, na které se podílí neurovaskulární jednotka (céva, neuron a gliová buňka – astrocyt). Zjednodušeně, aktivita neuronů moduluje změny v lokálním průtoku krve (a to jednak zprostředkovaně přenosem přes astrocyt, ale rovněž nezávisle na astrocytárním zprostředkování). (Phillips et al., 2016)

Neurogení kontrola mozkového průtoku

Extrakraniální a piální tepny jsou inervovány sympatickými nervovými vlákny, které vycházejí z horního krčního ganglia. K regulaci CBF přispívají prostřednictvím noradrenalinu a neuropeptidu Y. Hlavový parasympatikus (zejména neurony z ganglion pterygopalatinum a ganglion oticum) modulují tonus uvolňováním acetylcholinu, vazoaktivního intestinálního peptidu a oxidu dusnatého. Rovněž vlákna z trigeminálního ganglia uvolňují řadu dalších vazoaktivních mediátorů. Přestože přenáší úloha vazomotorických nervů v oblasti mozku stále není detailně prozkoumána, a přestože někteří autoři považují vliv autonomní inervace v oblasti autoregulační funkce krevního průtoku za méně významný (Phillips et al., 2016) je tato kontrola důležitou součástí celého komplexu regulace mozkové perfúze. Svou roli uplatňuje zejména na velkých cévách a nabývá na významu při náhlých změnách perfúzního tlaku (Willie et al., 2014)

1.2.2 Zobrazení mozkových tepen a vaskulárních změn CNS

1.2.2.1 Sonografie přírodních mozkových tepen a hlavních mozkových tepenných kmenů

Sonografické vyšetření je neinvazivní, nebolestivé a bezpečné vyšetření, používané klinické praxi rutinně. Jeho rozvoj vedl od využití pouze B-obrazu, přes začlenění dalších technik, jako je barevný, energetický a dopplerovský mód, k širokému používání v diagnostice cévních patologií.

Pomocí ultrazvukového vyšetření tepen krku, za použití sondy s emisní frekvencí 5-10 MHz, lze dobře zhodnotit karotické tepny a extrakraniální úsek obou AV. Při vyšetření odstupů ACC nebo truncus brachiocephalicus je vhodnější využít sondu s nižší emisní frekvencí 3-5 MHz. Při vyšetření posuzujeme jak strukturální charakteristiky cév (lumen, cévní stěna, tvar tepen, intimo-mediální šíře, přítomnost a struktura patologických útvarů, zejména aterosklerotických plátů), tak hemodynamické parametry krevního průtoku. Analýzou dopplerovské křivky lze tak získat informace o stavu vyšetřované cévy a krevního proudu nejen v místě měření, ale rovněž proximálního a distálního cévního řečiště.

Základními rutinně měřenými parametry jsou maximální systolická rychlost (peak systolic velocity, PSV) - maximální rychlost dosažená v průběhu jednoho srdečního

cyklu, konečná diastolická rychlost (end-diastolic velocity, EDV) - průtoková rychlost na konci diastoly, maximální střední průtoková rychlost (time-averaged maximum velocity, V_{mpeak}), střední průtoková rychlost (time-average mean velocity, V_m), Goslingův neboli pulzatilní index (PI). Ultrazvukové přístroje měří výše uvedené průtokové charakteristiky automaticky. Pokud při vyšetření nelze pro horší insonační podmínky získat kvalitní obraz, lze manuálně označit dopplerovskou křivku v průběhu vybraných srdečních cyklů a přístroj takto označenou křivku analyzuje a zobrazí PSV, EDV, V_m , PI. PI je definován jako rozdíl maximální systolické rychlosti a nejnižší diastolické rychlosti dělený střední průtokovou rychlostí během jednoho srdečního cyklu ($\text{maximální systolická rychlost} - \text{konečná diastolická rychlost} / V_m$). (Gosling a King, 1974). PI odráží stav distálního řečiště, resp. periferní cévní rezistenci v povodí měřené tepny. Může tak být využit jako marker mikroangiopatických změn v distálním vaskulárním řečišti v povodí insonované tepny. Vzestup pulzatilního indexu byl popsán u pacientů s různými cévními rizikovými faktory jako je hypertenze, diabetes, vyšší věk či mužské pohlaví (Kešnerová et al., 2022). Je známo, že věkově vázaný vzestup PI vykazuje rozdíly mezi pohlavími (výraznější vzestup s věkem je u žen) (Alwatban et al., 2021).

Pomocí transkraniální sonografie můžeme přes intaktní lebku v reálném čase měřit hemodynamické parametry v oblasti hlavních tepenných kmenů Willisova okruhu. Transkraniální dopplerovská sonografie (TCD) byla vyvinuta a zavedena do klinické praxe v 80. letech minulého století (Aaslid et al., 1982). Asi o 10 let později má počátek rozvoj transkraniální barevná duplexní sonografie (TCCS). Doplněním TCD o zobrazení intrakraniálních struktur ve dvojrozměrném B-obrazu a možnost přímé vizualizace vyšetřovaných cév (zobrazení cév v barevném i energetické modu) se díky TCCS rozšířily a zpřesnily možnosti diagnostiky v oblasti cerebrální cirkulace. V současné době je, podobně jako ultrazvukové vyšetření tepen krku, TCCS vyšetření používáno k hodnocení krevního průtoku mozkovými tepnami rutinně.

Při transkraniálním vyšetření se používá ultrazvuková sonda emitující vysoce pronikavý ultrazvukový svazek schopný překonat lebeční kostěnou překážku. K vyšetření se využívají anatomická místa v oblasti lbi, kde je kostěná bariéra nejtenčí, tzv. „okénka“, případně se využívají fyziologické lební otvory. Hodnocení ACM se provádí tzv. transtemporálním přístupem, M1 úsek lze zobrazit z transverzálního řezu

z úrovně mezencefala, distálnější úseky z řezů z úrovně thalamu a z úrovně postranních komor.(Školoudík, 2003)

Průtoková křivka a průtokové rychlosti, které získáváme pomocí transkraniální dopplerometrie, nejsou identické s krevním průtokem, nicméně velmi dobře odrážejí stav mozkové cirkulace. (Gosling a King, 1974; Greisen, 1986; Dahl et al., 1992)

Kromě přímého hodnocení hemodynamických parametrů z oblasti hlavních kmenů tepen Willisova okruhu lze pomocí funkčních vyšetření za použití TCD/TCCS posuzovat funkční stav malých mozkových tepen (arteriol). Hodnocením podnětem evokovaných změn krevního průtoku v hlavních kmenech tepen (např. M1 ACM) tak můžeme posoudit schopnost cerebrální autoregulace, funkční vazoreaktivity a funkční hyperémii v souvislosti s neuronální aktivací (neurovaskulární coupling) (Školoudík, 2003)

K vyšetření cerebrální autoregulace byla používána řada podnětů, které vedou ke zvýšení/změnám krevního tlaku a/nebo krevního průtoku. Mezi ně patří například použití Valsalvova manévru, komprese stehů tlakovými manžetami a jejich deflace, změny polohy těla (sed-stoj, dřep-stoj) či transientní komprese a uvolnění karotidy. (Claassen et al., 2016) Vyšetření využívající výše uvedené stimuly mají četná omezení (nároky na spolupráci, diskomfort vyšetřovaného). Proto se stále častěji v hodnocení cerebrální autoregulace uplatňují metody založené na hodnocení spontánních fluktuací krevního tlaku a krevního průtoku.

Sonografické hodnocení neurovaskulárního couplingu využívá zrakových a motorických podnětů k měření změn krevního průtoku v jednotlivých insonovaných tepnách.

Stanovení vazomotorické reaktivity pomocí sonografie

Podnětem evokované změny průtoku v tepně patří mezi testy, pomocí kterých lze hodnotit funkční stav mozkového tepenného řečiště. Při vyšetření vazomotorické rezervy (funkční vazoreaktivity, funkční rezervní kapacity) porovnáváme průtokové parametry v tepnách za klidových podmínek a po aplikaci stimulu. Nejčastěji užívaným vazodilatčním podnětem je hyperkapnie. Při zvýšení pCO₂ se z fyziologických podmínek průtok mozkovými tepnami zvyšuje. Zvýšení pCO₂ lze dosáhnout několika způsoby. Vdechováním vzduchu s vyšším obsahem CO₂ (Ringelstein et al., 1988), zadržením dechu (Markus a Harrison, 1992) či aplikací

acetazolamidu (Ringelstein et al., 1992). Acetazolamid blokuje karboanhydrázu, blokáda způsobuje lokální zvýšení koncentrace CO₂ vedoucí k dilataci mozkových arteriol.

Za předpokladu dobré spolupráce pacienta je běžně v klinické praxi i ve výzkumu citace využíván test se zadržením dechu. Pomocí TCD i MIR (BOLD) bylo prokázáno, že změny průtoku v ACM při použití testu zadržení dechu korelují s testy využívající inhalaci CO₂ či aplikaci Acetazolamidu (Müller et al., 1995; Kastrup et al., 2001). Test zadržení dechu využívá přechodný vzestup pCO₂ navozený apnoí. Hyperkapnie vede k výraznému zvýšení krevního průtoku. Na zvýšení průtoku krve mozkovými tepnami se podílí z části také hyperkapnií navozená elevace krevního tlaku. Větší vliv má však zvýšení pCO₂ v krvi. (Przybylowski et al., 2003)

Měření CVR pomocí zadržení dechu za použití TCD/TCCS v literatuře opakovaně popisováno u Alzheimerovy choroby a mírného kognitivního deficitu (Tomek et al., 2014; Urbanova et al., 2014; Shim et al., 2015; Diomedí et al., 2021), pacientů s migrénou (Silvestrini et al., 1995; Fiermonte et al., 1999; Akgün et al., 2015). Test zadržení dechu nevyžaduje žádný externí zdroj, ať už se jedná o zdroj CO₂ či acetazolamid. Je snadněji proveditelný v běžné klinické praxi.

1.2.2.2 Magnetická rezonance a vaskulární změny mozku

Zobrazení mozku pomocí MRI je základním nástrojem k vyhodnocení strukturálních změn odrážejících vaskulární poškození mozku na podkladě onemocnění malých tepen. Kromě detekce lakunárních infarktů a mikrohemoragií je možné pomocí volumetrického měření přesně objemově kvantifikovat postižení bílé hmoty. Na T1W obrazech MRI, stejně jako na CT, se chronické vaskulární změny zobrazují sníženou intenzitou obrazu (hypointenzity, hypodenzity), na rozdíl od T2W či FLAIR sekvencí MRI, které zobrazují tyto léze jako hyperintenzity. Vzhledem ke zřetelnějšímu zobrazení lézí na FLAIR či T2W sekvencích donedávna používala většina výzkumníků přednostně hodnocení lézí právě na těchto sekvencích, a to jak za použití vizuálních škál, tak s využitím volumetrické analýzy založené na automatickém (nebo manuálním) měření velikosti objemu lézí bílé hmoty. Nejčastěji používanou vizuální škálou k hodnocení rozsahu lézí bílé hmoty je Fazekašova čtyřstupňová škála (Fazekas et al., 1987.). Volumetrická analýza pomocí počítačových programů dokáže přesně kvantifikovat objem postižené bílé hmoty (v ml). V současné době existuje několik

automatizovaných a poloautomatizovaných metod pro segmentaci lézí bílé hmoty, které ke kvantifikaci využívají různé algoritmy.(Heinen et al., 2019). S vědeckým pokrokem a zlepšením technik zobrazení (využívání MPRAGE) došlo ke zvýšení citlivosti zobrazení i v T1W a volumetrické techniky se využívají i na těchto sekvencích. Navíc se ukazuje, že při použití automatického softwarového kvantifikování objemů lézí výsledky z T1W a z FLAIR sekvencí spolu silně korelují (Wei et al., 2019).

2. Cíle práce a hypotézy

2.1 Tematické okruhy

Tato disertační práce zahrnuje dva tematické okruhy, které byly zaměřeny na neurologické projevy u pacientů s Fabryho chorobou s důrazem na cerebrovaskulární problematiku.

1. První část se zabývá stanovením prevalence Fabryho choroby v populaci pacientů s akutní CMP a analýzou genotyp-fenotyp identifikovaných variant genu GLA
2. Druhá část zkoumá cerebrovaskulární abnormality detekované sonograficky a pomocí MRI mozku a stanovuje jejich prediktory jednak ve skupině pacientů s Fabryho chorobou a jednak ve srovnání se subjekty bez tohoto onemocnění.

2.2 Hypotézy a cíle

2.2.1 Práce 1: Stanovení prevalence Fabryho choroby u neselektovaných pacientů s akutní cévní mozkovou příhodou v České republice (1. tematický okruh)

FCh je známou příčinou cévní mozkové příhody u mladých pacientů (Rolfs et al., 2005; Sims et al., 2009). Vzhledem k omezenému množství dostupných informací o prevalenci FCh u pacientů s cerebrovaskulárním onemocněním mimo nejvíce studovanou skupinu mladých pacientů s kryptogenní ischemickou CMP jsme naplánovali studii v populaci neselektovaných pacientů (tj. bez ohledu na podtyp CMP, etiologii, pohlaví nebo věk) s iktem. Jak bylo uvedeno v úvodu, výskyt FCh v běžné populaci je odhadován na 0,0025-0,004 %. V ČR bylo v době plánování screeningové studie v Centru pro FCh sledováno 135 pacientů s tímto onemocněním. Počet obyvatel ČR k 30.8. 2017 byl 10 597 051 (Český statistický úřad, 2017). Výskyt diagnostikované FCh v ČR jsme na základě těchto údajů stanovili na 1:78 500 (0,0013%). Vzhledem k heterogenní klinické manifestaci nemoci a faktu, že CMP může být první manifestací choroby (Sims et al., 2009) jsme předpokládali, že prevalence FCh ČR je podhodnocena, a že v rizikové skupině neselektovaných pacientů s cévní mozkovou identifikujeme dosud nedagnostikované pacienty s FCh.

Hypotéza č. 1: Mezi pacienty s akutní CMP se nacházejí dosud nediodagnostikovaní nemocní s Fabryho chorobou.

Hlavním cílem první části prvního tematického okruhu, která probíhala pod záštitou Cerebrovaskulární sekce ČNS JEP, bylo stanovení prevalence FCh u pacientů s akutní CMP. Dalším cílem práce bylo zhodnotit, zda je nutné provádět screening FCh u neselektovaných pacientů s iktem v běžné klinické praxi, respektive pro které podskupiny pacientů je screening nemoci relevantní.

2.2.2 Práce 2: Podrobné fenotypové charakteristiky GLA variant identifikovaných v rámci celostátního screeningu pacientů s cévní mozkovou příhodou v České republice (1. tematický okruh)

Jak bylo nastíněno v úvodu, prevalence FCh se uvádí v širokém rozmezí. Jednou z příčin jsou heterogenní fenotypové projevy, od závažných multiorgánových postižení až po asymptomatické průběhy. Screeningové programy částečně zpřesnily odhady prevalence nemoci (Doheny et al., 2018). Zároveň však klinické charakteristiky nalezených variant a interpretace genetických dat v literatuře často chybí a není výjimkou, že varianty jsou z hlediska patogenity časem přehodnoceny (Niemann et al., 2013; Terryn et al., 2013; Lenders et al., 2016). Chybná klasifikace varianty jako patogenní má výrazný dopad nejen na pacienty a jejich rodiny, ale ovlivňuje nastavení zdravotní péče spojené s nemocí, a rovněž i vědecko-výzkumné činnosti. Naopak nesprávná klasifikace varianty jako benigní může diskvalifikovat nemocné z přístupu k účinné léčbě. Předpokládali jsme, že přesná podrobná analýza genotyp-fenotyp u námi identifikovaných variant GLA genu povede k identifikaci jak známých patologických variant či variant nejasného významu, případně přispěje ke zpřesnění jejich dalšího zařazení, tak k popisu variant nových.

Hypotéza č. 2 Genetická analýza variant GLA genu u pacientů s cévním postižením s následky CMP povede k identifikaci pacientů se známými patogenními variantami spojenými s Fabryho chorobou, ale i k popisu nových variant.

Cílem druhé části prvního tematického okruhu bylo pomocí strukturované klinické fenotypizace klasifikovat nalezené varianty genu GLA z hlediska patogenity u

pacientů s iktem a jejich příbuzných. Předpokládali jsme, že integrace genetických a klinických informací může vést k přesné kategorizaci varianty s cílem předejít chybné interpretaci varianty s nutností pozdějšího přehodnocení.

2.2.3 Práce 3: Cerebrovaskulární fenotyp u pacientů s Fabryho chorobou hodnocený pomocí ultrazvuku (2. tematický okruh)

Přesná patofyziologie vzniku CMP u pacientů s FCh není jasná. Důležitou patofyziologickou roli při vzniku mozkových příhod, ať už klinicky němých či manifestních, může hrát funkční a strukturální postižení stěn intra a extrakraniálních tepen zásobujících mozek.

Hypotéza č. 3:

Mezi pacienty s FCh a zdravými kontrolami existují rozdíly ve strukturálních a hemodynamických neurosonologických parametrech v oblasti extrakraniálních a intrakraniálních tepen.

Cílem neurosonologické studie bylo pomocí studie případů a kontrol zhodnotit přítomnost a tíži vybraných strukturálních a hemodynamických vaskulárních charakteristik CNS. Cílem studie extrakraniálních tepen byla analýza šíře intimo-medie v distální arteria carotid communis a analýza šíře vertebrální tepny v jejím úseku V2. Předpokládali jsme, v souladu s literaturou, že pacienti s FCh mají širší intimo-mediální komplex v ACC. Z publikovaných dat rovněž vyplývá, že FCh může vést k dilatační arteriopatii. Jak bylo uvedeno v úvodu, z tepen zásobujících mozek je nejvíce dat o tomto typu strukturálního postižení u tepen zadního mozkového povodí, konkrétně a. basilaris. Pokud je nám známo, šíře vertebrálních tepen ve vztahu k FCh hodnocena dosud nebyla. Cílem neurosonologické studie intrakraniálních tepen bylo, za použití transkraniální duplexní barevně kódované sonografie, zhodnocení průtokových rychlostí, pulzatilního indexu a vazoreaktivity střední mozkové tepny u pacientů s FCh a jejich porovnání se zdravou populací. Předpokládali jsme, že věkově vázaný pokles středních průtokových rychlostí na ACM je u pacientů s FCh výraznější v porovnání s pacienty bez tohoto onemocnění. Dále jsme předpokládali, že – vzhledem k mikrovaskulárnímu postižení vyskytujícím se u pacientů s FCh – bude

pulzatilní index u pacientů s FCh vyšší. Rovněž jsme předpokládali, že u pacientů s FCh dochází k narušení vazoreaktivity.

2.2.4 Práce 4: Prediktory cerebrovaskulárních abnormit u pacientů s Fabryho chorobou

Na vzniku cévních onemocnění mozku se podílí řada rizikových faktorů. Předpokládali jsme, že v populaci pacientů s FCh se budou na výraznějším postižení cév podílet nejen klasické rizikové faktory, ale také tíže samotné FCh.

Hypotéza 4:

U pacientů s FCh lze mezi vybranými klinickými parametry nalézt prediktory vaskulárního postižení

Cílem kohortové průřezové studie bylo mezi vybranými klinickými parametry identifikovat prediktory výraznějšího vaskulárního postižení (strukturální abnormality extrakraniální tepen, hemodynamické abnormality v ACM, strukturální postižení bílé hmoty hodnocené na MRI mozku) u nemocných s FCh. Vybrané parametry zahrnovaly jak ovlivnitelné a neovlivnitelné klasické rizikové faktory CMP, tak faktory vázané specificky na Fabryho chorobu. Předpokládali jsme, že i některé kombinace těchto faktorů mohou vysvětlit variabilitu pozorovaných parametrů ve skupině pacientů s FCh.

3. Metodika

3.1 První tematický okruh

3.1.1 Práce 1: Stanovení prevalence Fabryho choroby u neselektovaných pacientů s iktem v České republice

3.1.1.1 Charakteristika souboru

Celkem jsme do studie zařadili 986 pacientů. Nábor pacientů probíhal v iktových centrech v ČR v definovaném období, a to během října 2018, března 2019 a října 2019. Studijní populaci tvořili pacienti s akutní CMP bez ohledu na její typ (to znamená pacienti s TIA, s ischemickou CMP včetně žilních trombóz CNS, s hemoragickou CMP včetně subarachnoidálního krvácení). Účast ve studii byla podmíněna udělením písemného souhlasu s účastí v projektu včetně souhlasu s genetickým vyšetřením GLA genu. Další podmínkou účasti ve studii byl věk nad 18 let. Omezení horní věkovou hranicí nebylo stanoveno.

3.1.1.2 Schválení, souhlas pacienta

Studie byla provedena v souladu s Etickým kodexem Světové zdravotnické organizace (Helsinská deklarace z roku 1973, revize z roku 2013). Od všech účastníků jsme získali před vstupem do studie informovaný písemný souhlas, včetně souhlasu s diagnostickými postupy a analýzou anonymizovaných klinických údajů pro vědecké účely a souhlasu s genetickým vyšetřením. Protokol studie byl schválen Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze (10/18-S-IV) a byl proveden v souladu s institucionálními a národními etickými normami.

3.1.1.3 Sběr dat, provedená vyšetření

Klinická data jsme sbírali za pomoci Registry of Stroke Care Quality (RES-Q), internetové registrační databáze používané pro průběžné sledování kvality iktové péče všemi certifikovanými iktovými centry v ČR. Přestože je RES-Q primárně určen pro sledování kvality a zejména logistiky akutní iktové péče, byl během sledovaných období do registru přidán záznam o zařazení pacienta do naší studie. Zaznamenávali jsme základní demografické charakteristiky účastníků (věk, pohlaví), typ cévní mozkové příhody (ischemická CMP, TIA, trombóza mozkových žil a splavů, hemoragická CMP, subarachnoidální krvácení), přítomnost vaskulárních rizikových

faktorů (arteriální hypertenze, fibrilace síní, stenóza karotidy, CMP/TIA v anamnéze, kouření), tíži iktu podle škály NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale) a klinický funkční výsledek v době propuštění z hospitalizace pomocí modifikované Rankinovy škály (tabulka 3). Všichni pacienti byli klinicky vyšetřeni svým ošetřujícím lékařem podle Národního standardu péče o cévní mozkové příhody a transientní ischemické ataky (Škoda, 2016).

Tabulka č. 3: Modifikovaná Rankinova škála, upraveno podle Saver et al. (2021)

Charakteristika stavu/hodnocení			
	Skalární – tíže postižení	Popisné – popis zdravotního stavu pacienta	Valenční – jednoslovné hodnocení klinického výsledku
0	Žádné	normální zdravotní stav, stejný jako před CMP	ideální
1	Lehké	určité symptomy přítomny, ale bez omezení (bez disability)	výborný
2	Mírné	přítomno postižení (disabilita), ale soběstačný, nezávislý	dobrý
3	středně těžké	částečně závislý, chodící bez dopomoci druhé osoby	přiměřený
4	Těžké	závislý, nechodící samostatně	špatný
5	Těžké	vyžaduje trvalou péči	velmi špatný
6		mrtvý	

Vysvětlivky:
CMP = cévní mozková příhoda

3.1.1.4 Stanovení přítomnosti varianty genu GLA

Přítomnost varianty genu GLA jsme stanovovali pomocí metody suché krevní kapky, která kombinovala enzymové a genetické testování. Po získání informovaného souhlasu jsme pacientům odebrali vzorek žilní krve punkcí periferní žíly a přenesli ji na komerčně dostupný filtrační papír (CentoCard, CentoGene AG). Vzorky jsme nechali zaschnout při běžné pokojové teplotě. K další analýze jsme vzorky následně odesílali do určené studijní laboratoře CentoGene AG (Rostock, Německo). V případech, kdy nebylo možno po zaschnutí krevní kapky vzorek do laboratoře ihned odeslat, skladovali jsme vzorky v plastovém pouzdru při pokojové teplotě do doby odeslání, ne však déle než po dobu jednoho týdne. Algoritmus dalšího vyšetření suché krevní kapky pro screening přítomnosti varianty genu GLA byl závislý na pohlaví. U mužů byla pomocí fluorimetrie a kapalinové chromatografie-hmotnostní spektrometrie stanovena aktivita enzymu α -GAL A a koncentrace biomarkeru lysoGb3. (Aerts et al., 2008). V případě, že byla zjištěna snížená aktivita enzymu α -GAL A $< 15,3 \mu\text{mol/l/h}$ a/nebo zvýšená koncentrace lysoGb3 $> 1,8 \text{ ng/ml}$, byl v dalším kroku vzorek podstoupen k sekvenaci genu GLA. Gen GLA byl analyzován pomocí PCR a sekvenování (NGS-Illumina) celé kódující oblasti a vysoce konzervovaných sestřihových spojení exon-intron (použitá referenční sekvence genu GLA byla NM_000169.2). U žen, vzhledem k vysoké míře očekávaných falešně negativních výsledků enzymatických testů, bylo použito přímo sekvenování genu GLA. Pokud byl nalezen variantní genotyp, bylo provedeno měření lysoGb3. Výsledek screeningu přítomnosti varianty GLA genu byl zaslán odesílajícímu lékaři. Pacienti s pozitivními výsledky screeningu byli odesíláni z příslušných iktových center do specializovaného centra pro Fabryho chorobu ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze k dalšímu klinickému a laboratornímu vyšetření, včetně rodinného screeningu, za účelem stanovení podrobného fenotypu subjektů, korelaci genotyp-fenotyp a určení patogenity odhalených variant genu GLA.

3.1.1.5 Statistické zpracování

Demografická a klinická data jsme analyzovali pomocí deskriptivní statistiky. Srovnání příslušných shromážděných parametrů bylo provedeno podle přítomnosti diagnózy FCh a korigováno na vícenásobná srovnání. Pro spojitě proměnné jsme použili Mann-Whitneyho U test, pro nespojitě proměnné χ^2 test nebo Fisherův exaktní

test. Pro porovnání genotypových frekvencí jsme použili Fisherův exaktní test obsažený ve funkci EPITAB programu STATA. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné. Statistická analýza byla provedena pomocí programů IBM SPSS Statistics 25 (IBM, USA, 2017) a Stata/IC 16.1 (StataCorp LLC, USA, 2020).

3.1.2 Práce 2: Podrobné fenotypové charakteristiky GLA variant identifikovaných v rámci celostátního screeningu pacientů s cévní mozkovou příhodou v České republice

3.1.2.1 Charakteristika souboru

Studovanou populaci souboru představuje celkem 23 pacientů. Šestnáct nositelů varianty genu GLA bylo identifikováno ve screeningové studii pacientů s akutní CMP. U těchto případů, s výjimkou nositelů varianty D313Y, byla provedena analýza rodokmenu a následné genetické testování rodinných příslušníků, což vedlo k identifikaci sedmi příbuzných nesoucích variantu genu. Komplexní diagnostické vyšetření všech případů za účelem určení orgánových projevů FCh jsme provedli ve spolupráci s Centrem pro Fabryho chorobu při II. interní klinice kardiologie a angiologie VFN. Všechna vyšetření byla provedena podle interního protokolu českého Centra pro FCh pro vstupní hodnocení onemocnění, který se opírá o mezinárodní doporučení (Ortiz et al., 2018).

3.1.2.2 Schválení, souhlas pacienta

Studie byla provedena v souladu s Etickým kodexem Světové zdravotnické organizace (Helsinská deklarace z roku 1973, revize z roku 2013). Od všech účastníků jsme získali před vstupem do studie informovaný písemný souhlas, včetně souhlasu s diagnostickými postupy a analýzou anonymizovaných klinických údajů pro vědecké účely a souhlasu s genetickým vyšetřením. Protokol studie byl schválen Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze (10/18-S-IV, 01/21-S-IV) a byl proveden v souladu s institucionálními a národními etickými normami.

3.1.2.3 Sběr dat, provedená vyšetření, stanovení fenotypu, korelace genotyp-fenotyp

Základní klinické vyšetření

Od pacientů jsme získali anamnézu se zaměřením na případné projevy FCh, změřili jsme krevní tlak, tepovou frekvenci, dechovou frekvenci, výšku a hmotnost. Dále následovala klinická vyšetření.

Nervový systém

Vyšetření se skládalo ze strukturované anamnézy cílené na neurologické projevy FCh – známky periferní neuropatie, gastrointestinální symptomy, změny v pocení, tolerance tepla a fyzické zátěže, přítomnost předchozích CMP. Ke zhodnocení přítomnosti a tíže lézí bílé hmoty podstoupili subjekty MRI mozku, které zahrnovalo T1 vážené, T2 vážené a fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) sekvence, difuzně vážené sekvence (DWI, diffusion weighted images) a susceptibilně vážené zobrazení (SWI, susceptibility weighted images). Léze bílé hmoty byly kvantifikovány podle Fazekasovy škály (Fazekas et al., 1987). Dále jsme provedli vyšetření mozkových tepen pomocí sonografie (extrakraniální a transkraniální vyšetření) nebo CT angiografie nebo MR angiografie. U pacientů s patologickou variantou genu GLA jsme doplnili vyšetření intraepidermální denzity nervových vláken v kožní biopsii, korneální konfokální mikroskopie rohovky a kvantitativní testování senzitivity k objektivizaci přítomnosti neuropatie tenkých nervových vláken. Pacienti s patologickou variantou genu podstoupili vyšetření mozkomíšního moku.

Kardiologické vyšetření

V rámci vyšetření možných kardiálních projevů nemoci jsme natočili klidové 12svodové EKG, pacienti podstoupili echokardiografické vyšetření a vyšetření srdce pomocí magnetické rezonance. Dále jsme analyzovali některé biochemické parametry, N-terminální prohormon natriuretického peptidu (NT-proBNP) a vysoce senzitivní troponin I.

Vyšetření renálního systému

Ke zhodnocení možného postižení ledvin jsme změřili sérový kreatinin, cystatin C, analyzovali přítomnost a velikost proteinurie, vypočetli poměr albumin/kreatinin. V případě přítomnosti proteinurie či albuminurie jsme vypočetli albumin/protein exkreční poměr. Odhad glomerulární filtrace (estimated glomerular filtration, eGRF,

mL/min/1,73m²) jsme vypočetli za použití Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation se sérovým kreatininem a cystatinem (CKD-EPIkrea, CKD-EPIcys) (Levey et al., 2009). Podle GRF a albuminurie jsme podle Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO CKD Work Group 2013) určili kategorie tíže postižení ledvin.

Vyšetření oční a kožní

Podrobné oční vyšetření zahrnovalo vyšetření předního segmentu ve šterbinové lampě a fundoskopii. V rámci dermatologického vyšetření jsme se zaměřili na přítomnost typických angiokeratomů. Vyšetření bylo doplněno kapilaroskopií.

Stanovení aktivity alfa-GAL A

Aktivita enzymu byla v této části projektu měřena fluorometrickou metodou podle Mayese (Mayes et al., 1981). Výsledky měření jsme porovnali s aktivitou enzymu v naší skupině hemizygotů a heterozygotek.

3.2 Druhý tematický okruh

3.2.1 Práce 3: Cerebrovaskulární fenotyp u pacientů s Fabryho chorobou hodnocený pomocí ultrazvuku

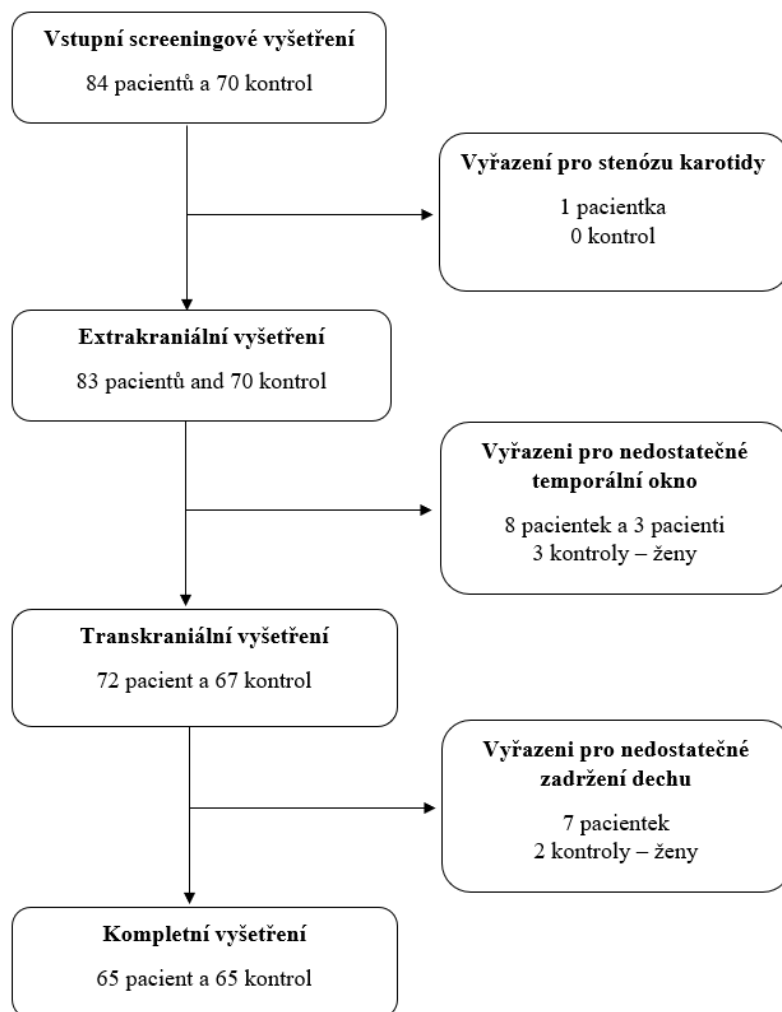
3.2.1.1 Charakteristika souboru

Celkem jsme do studie zařadili 154 subjektů. Do konečné analýzy bylo zařazeno 130 osob. Nábor účastníků studie byl zahájen v květnu 2018 a ukončen v říjnu 2022.

Zkoumanou populaci tvořili pacienti s patologickou variantou genu GLA (genetická analýza nebyla součástí studie, vycházeli jsme ze zdravotní dokumentace pacientů). Variantu GLA genu jsme považovali za patologickou na základě klinického obrazu pacientů, dále pokud byla popsána v publikované literatuře v případech spojených s klasickým multiorgánovým postižením, u mužů s nízkou či vymizelou aktivitou α -GAL A v plasmě či leukocytech, a také v případech s abnormální hladinou lysoGb3. Konsekutivně jsme do studie zařadili celkem 65 dospělých pacientů s FCh (38 žen, průměrný věk 47,24 let, rozmezí 20-73 let; 27 mužů, průměrný věk 47,56 let, rozmezí 20-70 let), kteří v rámci pravidelného sledování za účelem posouzení přítomnosti a závažnosti neurologických projevů nemoci byli vyšetřeni na Neurologické klinice

VFN. Šedesát pět osob bez FCh (průměrný věk 47,37 let, rozmezí 20-73 let) bylo rekrutováno na základě věku a pohlaví z registru dobrovolníků našeho Centra klinických neurověd. Kontrolní osoby odpovídaly případům věkem (v rozmezí dvou let v porovnání s věkem pacientů s FCh) a pohlavím. Vylučovacím kritériem pro zařazení kontrolních subjektů byla přítomnost neurologického onemocnění, vyjma anamnézy migrény.

Všeobecným vylučujícím kritériem pro účast v projektu (pro případy i kontroly) byla nedostatečná prostupnost temporálního kostního okna pro ultrazvukové vlnění s nemožností získat a udržet kvalitní ultrazvukový signál v průběhu vyšetření a nemožnost adekvátní spolupráce (zadržení dechu po dobu dostatečně dlouhou a bez použití Valsalvova manévru) a/nebo neochota podstoupit test zadržení dechu více než jednou. Pro zařazení do analyzovaného souboru byla nutná přítomnost obou temporálních oken tak, aby bylo možno získat parametry z obou ACM. Dalším vylučovacím kritériem byla přítomnost více než 50% stenózy v karotidy (ACC, ACI) nebo ACM. Výběr pacientů a kontrol do této části studie zobrazuje obrázek 2.



Obrázek 2: Diagram procesu výběru pacientů ve studii případů a kontrol

3.2.1.2 Schválení, souhlas pacienta

Studie byla provedena v souladu s Etickým kodexem Světové zdravotnické organizace (Helsinská deklarace z roku 1973, revize z roku 2013). Od všech účastníků jsme získali před vstupem do studie informovaný písemný souhlas, včetně souhlasu s diagnostickými postupy a analýzou anonymizovaných klinických údajů pro vědecké účely. Studii odsouhlasila Etická komise Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

3.2.1.3 Sběr dat, provedená vyšetření

Všichni účastníci studie podstoupili neurologické vyšetření. Zaznamenali jsme jejich výšku a hmotnost, vypočítali jsme BMI, změřili jsme krevní tlak a tepovou frekvenci.

Krevní tlak a tepová frekvenci jsme měřili v klidu, v poloze na zádech, bezprostředně po provedení sonografického vyšetření extrakraniálního úseku karotid a vertebrálních tepen. Zaznamenávali jsme základní demografické charakteristiky účastníků studie (věk, pohlaví), anamnestická data včetně přítomnosti komorbidit a vaskulárních rizikových faktorů (arteriální hypertenze, cukrovka, dyslipidémie, ischemická choroba srdeční, fibrilace síní, CMP/TIA v anamnéze, kouření, migréna, hyperurikémie). Následně jsme provedli extra a transkraniální sonografické vyšetření.

3.2.1.4 Vyšetření cerebrovaskulárního fenotypu

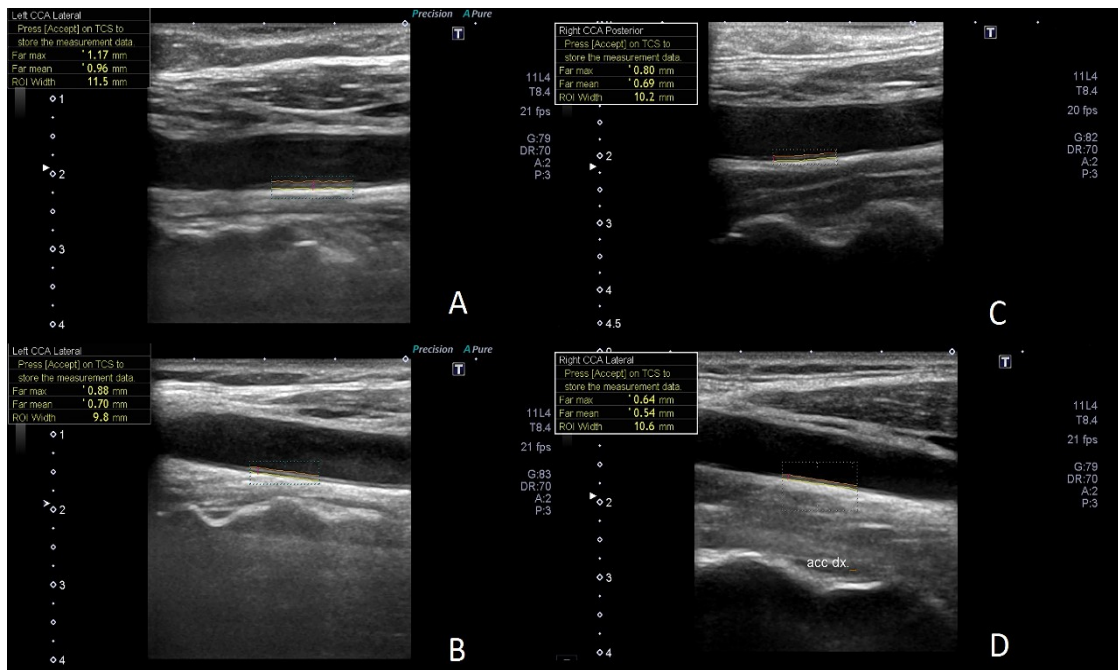
Pro charakteristiku cévního fenotypu jsme zvolili parametry strukturálního postižení velkých extrakraniálních tepen a strukturálního a funkčního postižení velkých a malých intrakraniálních tepen, které zahrnovaly: tloušťku intimo-medie v distální společné karotidě (cIMT), šíři vertebrální tepny v jejím extracerebrálním meziobratlovém průběhu (dVA), a dále klidovou střední průtokovou rychlost (V_{mb}), PI a vazoreaktivitu mozkových tepen stanovenou pomocí BHI (dále jen BHI) v arteria cerebri.

Neurosonologické vyšetření

Abychom zabránili variabilitě při vyšetřování různými vyšetřujícími, prováděla veškerá ultrazvuková vyšetření jedena sonografistka (Petra Reková), která je držitelkou certifikátu České neurologické společnosti (funkční odbornost v neurosonologii). Vyšetření jsme realizovali vždy ve stejné místnosti, v tichém prostředí, za normálních teplot (22-24°C) vždy ve stejné denní době (mezi 09:00 a 12:00 hodinou dopoledne) s vyloučením přímého slunečního světla. Sonografické vyšetření probíhalo ve vodorovné (bez jakékoliv elevace hlavy a trupu) poloze na zádech, s rukama podél těla a s nepřekříženými dolními končetinami.

Sonografické vyšetření extrakraniálních tepen – měření intimo-mediální šíře v distální společné karotida (cIMT) a měření šíře vertebrální tepny (dVA)

Vyšetření jsme prováděli v souladu s doporučeným postupem České neurosonologické společnosti pro vyšetření extrakraniálních a transkraniálních tepen (Škoda, 2002). Ke všem vyšetření využívali přístroj Toshiba Aplio 300. Náš postup měření cIMT (obrázek 3) vycházel z doporučeného postupu Mannheim IMT consensus (Touboul et al., 2012).

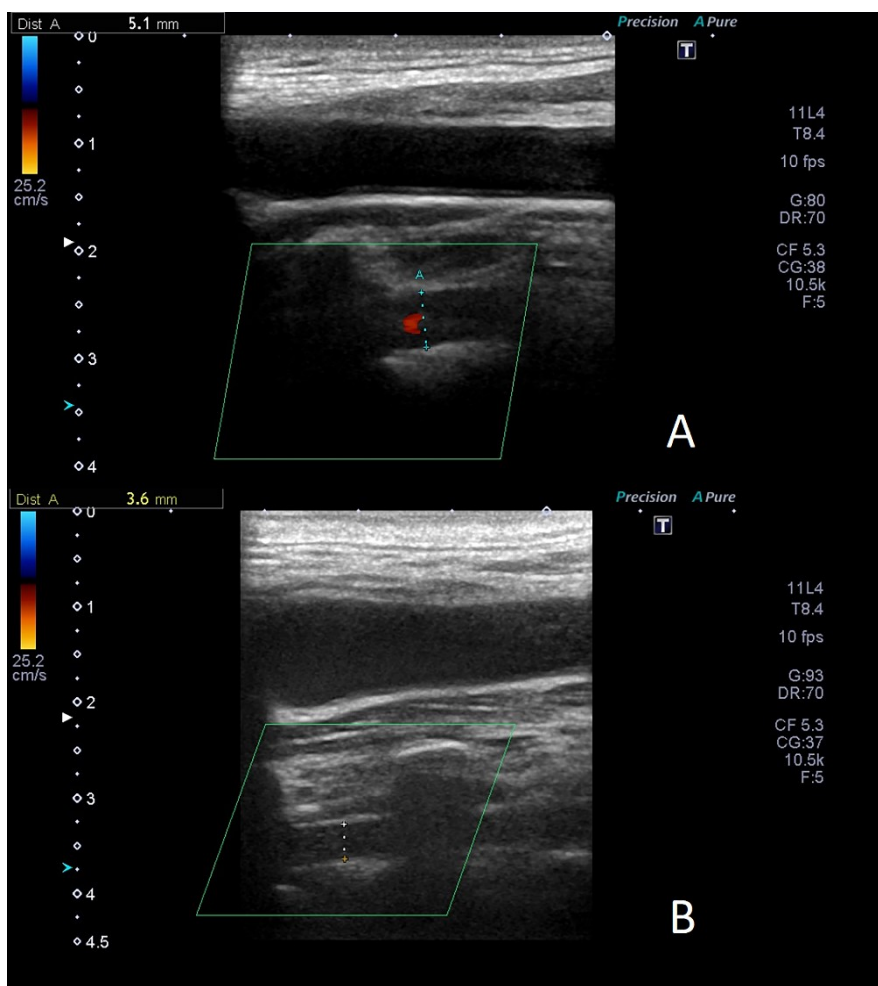


Obrázek 3: Měření tloušťky intimy-medie v distální společné karotidě u 73leté ženy s Fabryho chorobou (A), 73 leté ženy-kontroly (B) 35letého muže s Fabryho chorobou (C) a 35leté kontroly-muže (D). Distální společná karotida, podélný řez, B-mode.

Za použití sondy s nosnou frekvencí 10 MHz jsme nejdříve provedli vyšetření extrakraniálních tepen zásobujících mozek (pořadí ACC, ACI, AV), v pořadí vlevo, poté vpravo. Protokol zahrnoval vyšetření extrakraniálních tepen v B-modu k posouzení anatomických a morfologických poměrů, včetně měření IMT v distální ACC a průměru AV ve V2 úseku mezi obratli C5C6 nebo CC4C5. Následně jsme změřili průtokové rychlosti ve všech tepnách s využitím spektrálních průtokových křivek ze zvolené oblasti zájmu. Ke zhodnocení cIMT jsme provedli na každé straně (vpravo i vlevo) dvě měření, a to z laterálního přístupu, v místě, kde nebyly přítomny žádné aterosklerotické změny, cca 1-2 cm od bifurkace ACC. Hodnocený úsek byl asi 10 mm, k měření jsme využívali automatický software (AutoIMT – Toshiba Medical System, autoIMT poskytuje 80 měření na 5 mm v hloubce 3,5 cm nebo 70 v hloubce 4 cm). Měření bylo provedeno dvakrát na levé a dvakrát na pravé ACC. První měření cIMT jsme provedli na konci vyšetření ACC. Po posouzení bifurkace a proximálních segmentů arteria carotis interna a arteria carotis externa jsme se vrátili k distální ACC a provedli druhé měření cIMT. Všechny snímky, na kterých jsme hodnotili cIMT jsme zaznamenali jako smyčky obsahující alespoň tři srdeční cykly. Z nich jsme k měření

cIMT použili „zmrazené“ diastolické (měřeno v režimu B identifikací minimálního průměru tepny během srdečního cyklu) snímky tepen. Z každého měření jsme zaznamenali průměrnou hodnotu cIMT vypočítanou automatickým softwarem. Pro další analýzu jsme použili průměrnou hodnotu cIMT získanou ze všech 4 měření.

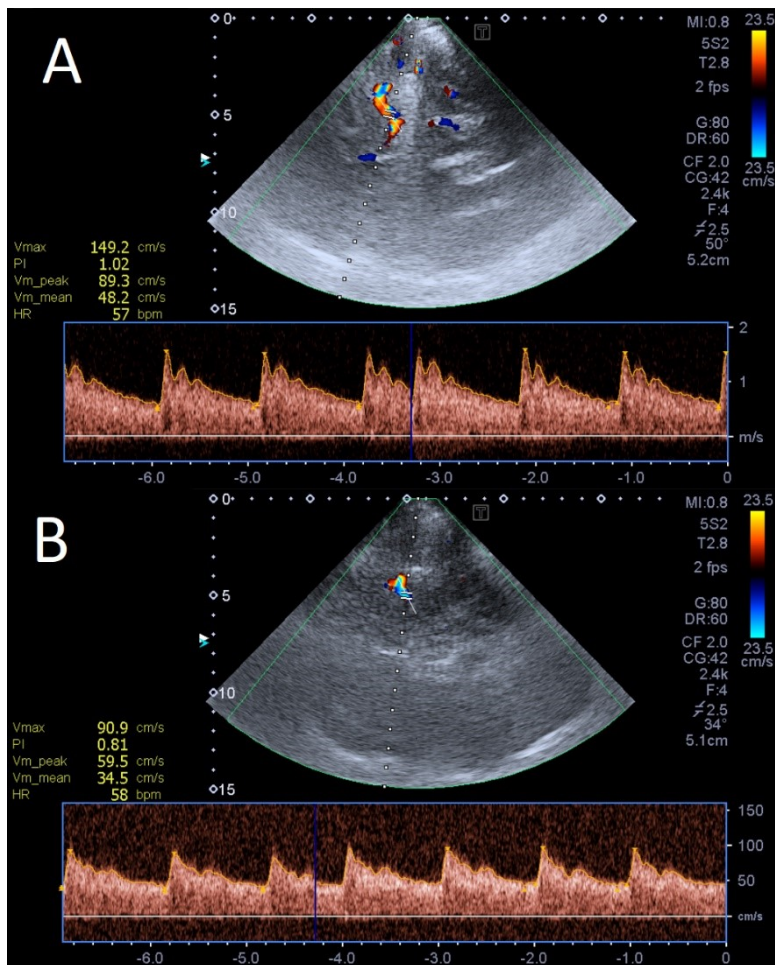
Průměr vertebrální tepny jsme měřili manuálně v B-modu ve středním krčním segmentu (V2) mezi čtvrtým a pátým nebo pátým a šestým krčním příčným obratlovým výběžkem. Měření jsme prováděli na obou stranách, v diastole (stanoveno pomocí barevného dopplerovského měření s individualizovaným nastavením parametrů přístroje tak, abychom se vyhnuli překrytí stěny tepny barevným zobrazením). Zaznamenávali jsme vnitřní průměr vertebrální tepny (obrázek 4).



Obrázek 4: Průměr vertebrální tepny u 46letého muže s Fabryho chorobou (A) a 47leté kontroly-muže (B). Vertebrální tepna mezi obratlovými výběžky páteře, podélný řez, barevně kódovaný sonogram (diastola)

Transkraniální ultrazvukové vyšetření – vyšetření průtokových parametrů ve střední mozkové tepně, měření indexu zadržetí dechu

Před začátkem transkraniálního vyšetření byli pacienti seznámeni s metodou zadržetí dechu a instruováni k provedení testu (zadržetí dechu na pokyn po normálním inspiriu s vyloučením Valsalvova manévru). Transkraniální vyšetření jsme prováděli pomocí 2 MHz sondy. Průtokové parametry jsme zaznamenávali ze střední mozkové tepny v hloubce 48-58 mm. Registrovali jsme klidovou střední vrcholovou rychlost průtoku krve (V_{mb}) a index pulzatility (PI). Oba parametry byly vypočteny automaticky pomocí automatického sledování křivky (obrázek 5). Střední průtoková rychlost byla vypočítávána automaticky jako časově zprůměrovaná maximální (vrcholová) rychlost. Výpočet PI byl rovněž prováděn pomocí automatizovaného softwaru, jako rozdíl mezi vrcholovou systolickou a nejnižší diastolickou průtokovou rychlostí vztažený k časově zprůměrované průtokové rychlosti za jeden srdeční cyklus (Gosling a King, 1974). Postupně jsme natočili 4 záznamy, první dva z levé ACM a druhé dva z pravé ACM. Mezi jednotlivými záznamy byla vždy nejméně tři minuty trvající pauza. U každého jednotlivého vyšetření jsme změřili nejprve průtokové parametry za klidových podmínek, a to střední průtokovou rychlost V_{mb} a pulzatilní index PI. Poté pacienti na pokyn zadrželi dech na co nejdéle dokázali, maximálně však na 30 vteřin. Bez prostředně po ukončení apnoe jsme změřili a zaznamenali průtokové parametry, střední průtokovou rychlosti (střední průtoková rychlost po apnoi, V_{ma}) a pulzatilní index po apnoi (PIa). Rovněž jsme zaznamenali délku trvání apnoe ve vteřinách. BHI byl vypočten podle rovnice $(V_{ma}-V_{mb})/(V_{mb}*\text{čas zadržetí dechu})*100$. Pro další statistickou analýzu jsme dle použili průměrné hodnoty V_{mb} , PI a BHI získané ze všech 4 měření. K popisu rozdílné variability měření BHI mezi opakovanými měřeními byl BHIvar vypočten jako výběrová směrodatná odchylka měření BHI na obou stranách dohromady.



Obrázek 5: Vizualizace levé střední mozkové tepny v úhlově korigované měření rychlosti průtoku. Spektrální průtoková křivka v hloubce 51 mm u 30letého muže s Fabryho chorobou (A) a v hloubce 52 mm u 30leté kontroly – muže (B). Transkraniální barevně kódovaný duplexní obraz.

3.2.1.5 Statistické zpracování

Demografické a klinické charakteristiky byly hodnoceny dohromady jednak pro pacienty s FCh a jednak pro kontroly, a dále rozděleně podle pohlaví. Rozdíly mezi pacienty s FCh a kontrolami byly hodnoceny buď pomocí dvouvýběrového t-testu s předpokladem stejných rozptylů (pro spojité proměnné) a dvouvýběrového proporčního z-testu (pro binární proměnné). Navíc, pokud při hodnocení binárních proměnných klesl očekávaný podíl pro alespoň jednu buňku pod 5, byl použit neparametrický Fisherův exaktní test.

Rozdíly mezi pacienty s FCh a kontrolami ve sledovaných neurosonologických parametrech (cIMT, dVA, Vmb, BHI, BHIvar, PI) byly analyzovány pomocí lineárních regresních modelů. Vzhledem k tomu, že jsme předpokládali, že FCH může být důvodem neurosonologických změn, Fabry status byl modelován jako prediktor ve všech modelech. Všechny výsledky měly přibližně Gaussovo rozdělení. V prvním kroku byly na všechny subjekty, a dále pro jednotlivá pohlaví, použity jednoduché regresní modely pro každý parametr, pouze s rozlišením FCh vs. kontrola. Ve druhém kroku vícerozměrné regresní modely hodnotily vliv přítomnosti FCh na každý sledovaný parametr, po korekci na příslušné kovariáty: kontinuální věk a BMI a binární pohlaví. Vícerozměrné modely nemohly být upraveny pro vliv typických vaskulárních rizikových faktorů – aktivního kouření, výskyt DM, hypertenze a dyslipidémie, protože v populacích nebyl dostatek případů nebo kontrol s těmito faktory. Pokud mají kovariáty vysoce nevyvážené rozdělení nebo pokud se nevyskytují často způsobují nestabilitu statistických modelů a není možné je zahrnout.

Pro zjištění vlivu pohlaví (nebo věku) na rozdíly v neurosonologických výsledcích mezi FCh a kontrolami, jsme použili vícerozměrné regresní modely, které zahrnovaly obousměrné interakce mezi pohlavím (nebo věkem) a binárním prediktorem FCh (pacient vs. kontrola). I zde byla v modelech zahrnuta korekce pro věk (nebo pohlaví) a BMI. Pokud byla p-hodnota interakce významná nebo téměř významná, byly popsány genderově nebo věkově specifické účinky na asociaci mezi FCh a neurosonologickými výsledky.

Vzhledem k průzkumné povaze tohoto článku jsme p-hodnoty menší než 5 % považovali za významné. Všechny analýzy byly provedeny v Stata/BE 17.0, Stata Statistical Software (StataCorp LLC, USA, 2021).

3.2.2 Práce 4: Prediktory cerebrovaskulárních abnormit u pacientů s Fabryho chorobou

3.2.2.1 Charakteristika souboru

V kohortové studii jsme vyšetřili celkem 85 pacientů (46 žen, průměrný věk 47,70, rozmezí 20-76 let, 39 mužů, průměrný věk 50,15, rozmezí 20-72 let), s FCh. Všichni pacienti byli nositelé patologické varianty GLA genu. Patogenita varianty byla určena

stejným způsobem jako v práci č. 3. Do studie byli postupně zařazováni pacienti, kteří v rámci pravidelného sledování za účelem posouzení přítomnosti a závažnosti neurologických projevů nemoci byli v období od května 2018 do prosince 2021 vyšetřeni na Neurologické klinice VFN. (extenze subjektů s FCh z předchozího souboru, z práce č. 3).

Všeobecným vylučujícím kritériem pro účast v této části projektu byla nedostatečná dostupnost temporálního kostního okna pro ultrazvukové vlnění s nemožností získat a udržet kvalitní ultrazvukový signál v průběhu vyšetření a nemožnost adekvátní spolupráce (zadržetí dechu po dobu dostatečně dlouhou a bez použití Valsalvova manévru). Pro zařazení do analyzovaného souboru stačilo získání zkoumaného parametru alespoň z jedné tepny. Dalším vylučovacím kritériem byla přítomnost více než 50% stenózy v karotidy (ACC, ACI) nebo ACM.

3.2.2.2 Schválení, souhlas pacienta

Studie byla provedena v souladu s Etickým kodexem Světové zdravotnické organizace (Helsinská deklaráce z roku 1973, revize z roku 2013). Od všech účastníků jsme získali před vstupem do studie písemný informovaný souhlas, včetně souhlasu s diagnostickými postupy a s analýzou anonymizovaných klinických údajů pro vědecké účely. Studii odsouhlasila Etická komise Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

3.2.2.3 Sběr dat, provedená vyšetření

U pacientů jsme zaznamenávali stejné demografické, anamnestické a klinické charakteristiky, jak uvádíme ve studii č. 3. Oproti studii č. 3 jsme navíc zaznamenávali tyto další údaje: Typ varianty, celkem 69 pacientů mělo genetickou variantu resultující v klasický fenotyp nemoci a 16 pacientů bylo nositeli varianty GLA c.644A>G, která resultuje ve fenotyp s pozdním začátkem s dominantním kardiálním postižením. Počet dnů léčby specifickou terapií, pacienti, kteří byli léčeni méně než 30 dní byli považováni pro účely naší studie za neléčené. Anamnézu jsme doplnili o údaj o přítomnosti/nepřítomnosti syndromu spánkové apnoe. U pacientů bez kontraindikací jsme provedli MRI mozku. Některá provedená vyšetření byla součástí rozsáhlejšího systematického diagnostického programu, který probíhá v Centru pro Fabryho chorobu při II. Interní klinice kardiologie a angiologie VFN. Tento program také zahrnuje echokardiografické a laboratorní vyšetření pacientů s FCh. Z dokumentace

jsme extrahovali výsledky echokardiografického vyšetření, a hodnotu hematokritu a popis záznamu z 12svodového EKG. Dále jsme pomocí škály MSSI spočítali celkovou tíži Fabryho choroby. Škála MSSI byla specificky vyvinuta pro pacienty s FCh a je tvořena čtyřmi pododdíly zahrnující projevy nemoci v základních doménách – obecné symptomy nemoci, neurologické projevy, přítomnost renálního postižení a srdeční projevy. Celkové skóre nabývá hodnot od 0 do 76 (čím vyšší skóre, tím výraznější multiorgánové postižení) (Whybra et al., 2004). Všechna vyšetření podstoupili pacienti v průběhu pěti dnů. Při stanovení MSSI skóre, výsledku hematokritu a přítomnosti syndromu spánkové apnoe jsme vycházeli z posledních dostupných vyšetření zaznamenaných ve zdravotní dokumentaci pacientů.

3.2.2.4 Prediktory cerebrovaskulárního postižení

Mezi získanými vybranými klinickými a laboratorními parametry jsme stanovovali prediktory cerebrovaskulárního postižení u pacientů s FCh. Za použití sonografie jsme rovněž zkoumali strukturální (cIMT, dVA) a funkční (Vmb, PI, BHI, BHIvar) cerebrovaskulární charakteristiky. Navíc jsme hodnotili stejné prediktory ve vztahu k přítomnosti a velikosti objemu hypointenzních lézí na T1 vážených obrazech MRI mozku.

Neurosonologické vyšetření

Metodika sonografického vyšetření byla shodná s metodikou použitou v práci č. 3.

Magnetická rezonance mozku

Pacienti, kteří neměli kontraindikaci k vyšetření pomocí magnetické rezonance, podstoupili vyšetření pomocí magnetické rezonance na 3T přístroji (MAGNETOM Skyra, Siemens Healthcare, Erlangen, Německo). Byla použita standardní 20ti kanálová cívka. Protokol byl standardizován a pro segmentaci lézí sestával z trojrozměrného skenu s vysokým rozlišením (magnetization-prepared rapid acquisition gradient echo, 3D-MPRAGE) a 3D-fluid attenuated inversion recovery (FLAIR-SPACE) sekvencí.

Objemy hypointenzních lézí v bílé hmotě byly vypočítávány z trojrozměrné T1 vážené sekvence MPRAGE (repetiční čas 2300 ms, echo čas 2,26 ms, inverzní čas 732 ms, sklápěcí úhel 8 stupňů., tloušťka řezu 1,0/0 mm) s využitím FreeSurfer softwaru (verze 5.3.0, <https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>, Harvard University, Boston, MA, USA),

který umožňuje automatické zpracování obrazu a segmentaci hypointenzních lézí bílé hmoty (Fischl, 2012). FreeSurfer byl spuštěn s parametry „-mprage“ a „-3T“ jak doporučeno (Guo et al., 2019).

3.2.2.5 Statistické zpracování

K vyhodnocení faktorů, které mají významný vliv na studované vaskulární parametry u pacientů s FCh byla nejprve provedena univariabilní analýza s klinickými (věk, pohlaví, typ varianty, stav léčby, tíže nemoci hodnocené pomocí MSSI), hemodynamickými (systolický krevní tlak, diastolický krevní tlak, tepová frekvence, hematokrit) a vaskulárními rizikovými faktory (BMI, hypertenze, dyslipidémie, DM, anamnéza cévní mozkové příhody nebo TIA, aktivní kouření, přítomnost obstrukční spánkové apnoe) Pro meziskupinová porovnání pro binární prediktory (např. pohlaví při aktivní kouření), byly použity t-test pro srovnání výsledku mezi dvěma podskupinami pacientů rozdělených podle daného hlavního faktoru, pro kontinuální prediktory Pearsonův korelační koeficient. V dalším kroku byla vícerozměrná regresní analýza, dopředného krokového typu ($F=0,5$ pro zahrnutí do výsledného modelu, max. 10 iterací). V tomto kroku byly jako kovariáty předem definované pro daný model (viz Tabulka 12 a 13), a pro “post-hoc” model byly použity jako vstupy faktory signifikantně ($p<0,05$) asociované s daným parametrem v předchozí jednorozměrné analýze. Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí software STATISTICA verze 12 (Statsoft INC, 2013, www.statsoft.com).

4. Výsledky

4.1 První tematický okruh

4.1.1 Stanovení prevalence Fabryho choroby u pacientů s akutní CMP v České republice.

Podrobné fenotypové charakteristiky GLA variant identifikovaných v rámci celostátního screeningu pacientů s cévní mozkovou příhodou v České republice.

Do první studie jsme postupně zařadili celkem 986 pacientů s akutní CMP. Detailní demografické a klinické charakteristiky pacientů jsou uvedeny v tabulce 4.

Průměrný věk pacientů, ve kterém došlo k CMP, byl 70,0 let (SD 12,8; rozmezí 24-97 let). Ischemickou CMP jsme diagnostikovali u celkem 76,6 % případů, 13,4 % subjektů prodělalo TIA, v 6,4 % měli pacienti intracerebrální krvácení, u 0,5 % bylo diagnostikováno krvácení subarachnoidální a v 0,1 % případů se jednalo o cerebrální žilní trombozu. Celkem u šestnácti (1,6 %) pacientů byla zjištěna varianta genu GLA. Diagnostikovali jsme celkem 8 různých variant tohoto genu. Detailní klinické charakteristiky pacientů s variantami GLA genu jsou uvedeny v tabulce 5 a 6. Pacienti s přítomností varianty GLA genu byli v porovnání s pacienty normálním genotypem obecně mladší (průměrný věk 60,0 vs. 70,1 let, $p=0,0210$, rozmezí 34-83 let), dále jsme pozorovali trend k menšímu zastoupení mužů (37,5 % vs. 54,6 %) a vyšší hodnotě NIHSS v době přijetí (5,6 vs. 4,2). Hlavní rizikové faktory u probandů – nositelů variant GLA genu ukazuje tabulka 7.

Ve druhé studii, ve které jsme stanovovali patogenitu (korelace genotyp-fenotyp) nalezených variant, bylo zahrnuto kromě 16 pacientů nalezených pomocí screeningu mezi pacienty s CMP rovněž 7 pozitivně testovaných rodinných příslušníků. Pomocí podrobného vyšetření fenotypu s přihlédnutím k obecně známým či literárně dostupným údajům jsme dvě nalezené varianty genu GLA určili jako patologické (což odpovídá 0,2 % z celkového počtu souboru pacientů s iktem) a zbývajících 8 (nositeli bylo 14 probandů, což odpovídá 1,4 % všech pacientů s CMP, a jejich čtyři příbuzní) jsme zařadili mezi varianty nejasného významu.

Tabulka 4: Demografické a klinické parametry pacientů s akutním cévní mozkovou příhodou, kteří podstoupili screening na přítomnost variant genu GLA

	Celá kohorta	Pozitivní výsledek screeningu = pacienti s variantou genu GLA	Negativní výsledek screeningu = pacienti bez varianty genu GLA	P-hodnota mezi skupinami *
Počet pacientů, n (%)	986	16 (1,6)	970 (98,4)	
Muži, n (%)	536 (54,4)	6 (37,5)	530 (54,6)	0,172
Věk – průměr, (SD) rozpětí (roky)	70,0 (12,8) 24-97	60,1 (16,8) 34-83	70,2 (12,7) 24-97	0,021
Ischemická CMP, n (%)	782 (79,3)	13 (81,3)	769 (79,3)	0,845
TIA, n (%)	134 (13,6)	2 (12,5)	132 (13,6)	0,897
hCMP, n (%)	64 (6,5)	1 (6,3)	63 (6,5)	0,968
SAK, n (%)	5 (0,5)	0	5 (0,5)	0,685
MŽ trombóza, n (%)	1 (0,1)	0	1 (0,1)	0,856
Fibrilace síní, n (%)	211 (21,4)	2 (12,5)	209 (21,5)	0,545
Hypertenze, n (%)	771 (78,2)	10 (62,5)	76 (78,5)	0,132
Kouření, n (%)	256 (26,0)	5 (31,3)	251 (25,9)	0,634
Symptomatická stenóza ACI > 50 %, n (%)	122 (12,4)	3 (18,8)	119 (12,3)	0,435
Rekurentní CMP, n (%)	199 (20,2)	2 (12,5)	197 (20,3)	0,489
Průměrné počáteční NIHSS, body, (SD) rozpětí (body)	4,2 (5,2) 0-32	5,6 (4,5) 2-15	4,2 (5,1) 0-32	0,057
Klinický výsledek při dimisi (mRS 0-2), n (%)	644 (67,2)	14 (87,5)	630 (66,9)	0,107
<p>Vysvětlivky: *) χ^2 test, Fisherův exaktní test nebo Mann-Whitney U test</p> <p>CMP = cévní mozková příhoda; TIA = transitorní ischemická ataka; SAK = subarachnoidální krvácení; hCMP = hemoragická cévní mozková příhoda; MŽ = mozková žilní; ACI = arteria carotis interna; NIHSS = National Institute of Health Stroke Scale, mRS = modifikovaná Rankinova škála</p>				

Tabulka 5: Genotypové a fenotypové charakteristiky pacientů s patogenními mutacemi a variantami nejasného významu GLA genu

No.	Charakteristika varianty	Demografické informace			Biochemický fenotyp				Klinický fenotyp																			
									charakteristické symptomy						Postižení hlavních orgánů													
									Změna aminokyseliny		pohlaví	BMI	věk (y)	α-Gal A aktivita			lyso-Gb ₃	oči		kůže	nervový systém			srdce			ledviny†	
														DBS μmol/ml/h	plazma μmol/ml/h	leukocyty μmol/mg/h	DBS ng/ml	vinuté cévy	kornea verticillata	fabry katarakta	AG	pocení	neuropatická bolest či SFN	GIT	iktus	WMA/Fs	EKG	LVH
FCh patogenní GLA mutace																												
1.0	G325S	M	27,7	34	<2,8	0,22‡	11,3‡	19,8	+	+	+	-	-	+	-	+	-/F0	-	-	-	A1	G1						
1.1	G325S	F	28,4	58	na	na	Na	3,6	+	+	-	+	-	-	-	-	+ / F1	-	-	-	A1	G2						
2.0	T412Sfs*?	F	26,9	41	na	6,22	33,1	5,5	+	+	-	-	-	-	-	+	-/F0	-	-	-	A1	G1						
2.1	T412Sfs*?	M	18,6	12	na	0,18	0,1	26,9	-	+	-	+	-	-	+	-	na	-	-	na	A1	G1						
2.2	T412Sfs*?	F	20,9	10	na	1,62	26,1	Na	-	+	-	-	-	-	-	-	na	-	-	na	A1	G1						
GLA varianta nejasného významu nebo pravděpodobně benigní varianta																												
3.0	R118C	F	30,8	47	na	0,26	64,7	0,8	-	-	-	-	-	-	-	+	+ / F1	-	+	-	A1	G1						
3.1	R118C	F	25,7	52	na	2,64	34,5	1,0	-	-	-	-	-	+	-	+ / F1	-	-	na	-	A1	G2						
4.0	A143T	F	25,2	70	na	1,88	30,1	1,1	-	-	-	-	-	-	-	+	+ / F1	LAH	-	-	A1	G1						
4.1	A143T	F	31,2	50	na	na	Na	1,2	na	na	na	-	-	-	-	-	na	-	na	na	A1	G1						
5.0	R38G	F	24,7	78	na	1,7	22,7	1,0	-	-	-	+	-	-	-	+	+ / F2	AF	-	na	A2	G2						
6.0	R30K	F	na	83	na	na	na	1,0	na	na	na	na	na	na	na	+	na	-	na	na	na	na						
6.1	R30K	F	22,9	46	na	3,74	68,5	1,0	+	-	-	-	-	-	-	-	-/F0	-	-	-	A1	G1						
7.0	V199A	M	na	78	9,4	na	na	1,3	na	na	na	na	na	na	na	+	na	AF	na	na	na	na						
Vysvětlivky:																												
α-GAL A = Alfa-galaktosidáza A; Nr. = číslo pacienta; BMI = body mass index; y = věk v době vyšetření v Centru pro Fabryho chorobu; PNS = periferní nervový systém; CNS = centrální nervový systém; DBS = suchá krevní kapka; AG = angiokeratomy; SFN = neuropatie tenkých vláken; GIT = gastrointestinální projevy; WMA = abnormality bílé hmoty; Fs = Fazekasova škála; EKG = elektrokardiografie; LVH = hypertrofie levé komory; LGE = pozdní gadoliniový enhancement; Alb = albumin; GRF = glomerulární filtrace; FCh = Fabryho choroba; M = muž; F = žena; LAH = levý přední hemiblok; FS = fibrilace síní; plus + indikuje postižení orgánů, minus - indikuje stav bez orgánové patologie. Kontroly α-GAL A v leukocytech 22-88 nmol/mg/h, n = 181, v plazmě 2,4 – 19,4 nmol/ml/h, n = 186, v DBS 15,3 μmol/L/h; lysoGb ₃ v DBS 1,8 ng/ml. ‡ aktivita enzymu při terapii migalastatem, aktivita před léčbou dostupná z DBS.																												

Tabulka 6: Fenotypové charakteristiky pacientů s variantou c.937G>T, p.Asp 313Tyr (D313Y).

No.	demografické informace		Fenotyp																
	pohlaví	BMI	věk (y)	lyso-Gb ₃	Charakteristické symptomy						Postižení hlavních orgánů								
					oči			skin	Nervový systém		srdce			ledviny*					
	ng/ml	vinuté cévy	kornea verticillata	fabry katarakta	AG	pocen	PNS		CNS			EKG	LVH	LGE	alb	GRF			
neuropatická bolest							GIT	iktus	WML/F _s	jiné									
8.0	M	25,9	43	1,6	+	-	-	-	-	-	-	+	+/F2	-	LAH	-	-	A1	G2
9.0	M	26,7	54	1,0	-	-	-	-	-	-	-	+	+/F1	-	-	-	na	A2	G1
10.0	F	35,9	44	1,0	+	-	-	-	-	-	-	+	-/F0	LSA	-	-	na	A1	G2
11.0	M	25,8	64	1,1	+	+	-	-	-	-	-	+	+/F2	LSA, ACM stenóza	iRBBB	-	na	A1	G1
12.0	F	n.d.	83	1,4	na	na	na	-	-	-	-	+	na	-	-	-	na	na	G3b
13.0	F	n.d.	72	0,9	na	-	na	na	na	na	na	+	na	na	na	na	na	na	na
13.1	F	36,9	47	1,1	-	-	-	-	-	+	-	-	-/F0	-	-	-	na	A1	G1
14.0	F	31,9	71	1,2	-	-	-	-	-	-	-	+	-/F0	epilepsie	-	-	na	A1	G1
15.0	M	38,4	59	1,1	na	na	na	na	na	na	na	+	na	na	na	-	na	na	G1
16.0	F	17,4	44	1,1	na	na	na	-	-	-	-	+	na	-	na	na	na	na	G1

Vysvětlivky: Nr. = číslo pacienta; BMI = body mass index; y = věk v době vyšetření v Centru pro Fabryho chorobu; PNS = periferní nervový systém; CNS = centrální nervový systém; AG = angiokeratom; GIT = gastrointestinální symptomy; WML = léze bílé hmoty (white matter lesions); F_s = Fazekasova škála; LSA = lehká spánková apnoe; ACM = arteria cerebri media; EKG = elektrokardiografie; LVE = hypertrofie levé komory (left ventricular enlargement); LGE = late gadolinium enhancement; GRF = glomerulární filtrace; M = muž; F = žena (female); LAH = levý přední hemiblok; iRBBB = inkompletní blok levého Tawarova raménka; na = není k dispozici (not available); n.d. = neprovedeno; alb = albuminurie; * kategorie určena dle kidney disease improving global outcomes; plus + označuje postižení orgánu; mínus - označuje nepřítomnost orgánové manifestace nemoci

Tabulka 7: Hlavní rizikové faktory CMP u probandů – nositelů jednotlivých variant GLA genu

Nr.	Charakteristika varianty		Rizikové faktory CMP					
	c.DNA změna	Změna aminokyseliny	HN	DM	Onemocnění srdce	DL	Předchozí CMP nebo TIA	kouření
Patogenní varianty								
1.0	c.973G>A	p.Gly325Ser	-	-	-	-	-	+
2.0	c.1235_1236delCT	p.Thr412Serfs* ?	-	-	-	-	-	+
Varianty nejasného významu nebo pravděpodobně benigní varianty								
3.0	c.352C>T	p.Arg118Cys	+	-	-	-	-	-
4.0	c.427G>A	p.Ala143Thr	+	-	-	+	-	-
5.0	c.112A>G	p.Arg38Lys	+	-	FS	-	+	-
6.0	c.89G>A	p.Arg30Lys	+	-	-	-	-	-
7.0	c.596T>C	p.Val199Ala	-	-	ICHS, FS	-	-	+
8.0 #	c.937G>T	p.Asp313Tyr	+	-	-	-	-	-
9.0	c.937G>T	p.Asp313Tyr	-	-	PFO	+	-	+
10.0	c.937G>T	p.Asp313Tyr	-	-	-	-	-	-
11.0	c.937G>T	p.Asp313Tyr	+	-	+	+	-	-
12.0	c.937G>T	p.Asp313Tyr	+	+	ICHS	+	-	-
13.0	c.937G>T	p.Asp313Tyr	+	-	ICHS	-	-	-
14.0	c.937G>T	p.Asp313Tyr	+	-	PFO	+	-	-
15.0	c.937G>T	p.Asp313Tyr	+	-	-	-	-	+
16.0	c.937G>T	p.Asp313Tyr	-	-	-	-	+	-
<p>Vysvětlivky: Nr.= číslo subjektu, CMP=cévní mozková příhoda; HN = arteriální hypertenze; DM = diabetes mellitus; DL = dyslipidémie; TIA=transitorní ischemická ataka; FS=fibrilace síní; ICHS=ischemická choroba srdeční; PFO=foramen ovale patens; + označuje přítomnost nálezu; - označuje nepřítomnost nálezu; # pacient s krvácením do bazálních ganglií</p>								

Patologické varianty

Patologické varianty jsme našli u dvou probandů a dále v rámci rodinného screeningu jsme identifikovali další tři rodinné příbuzné se stejným genotypem. Konkrétně jsme v populaci pacientů s iktem identifikovali 34letého muže, c.973G>A, G325S and a 41letou ženu. c.1235_1236delCT, T412Sfs*?. Detailní vyšetření nositelů těchto variant v našem souboru ukazuje, že obě patologické varianty resultují v klasický fenotyp.

Varianty nejasného významu a pravděpodobně benigní varianta

Nejčastěji zastoupenou genetickou variantou, kterou jsme identifikovali u celkem devíti pacientů, byla varianta c.937G>T, D313Y. Jeden z nositelů této varianty byl 41letý muž s typickým intracerebrálním krvácením do bazálních ganglií, ostatní pacienti měli ischemický iktus.

Dále jsme identifikovali tyto typy variant - c.112 A>G, p.R38G, u 78leté ženy, c.352C >T, R118C u 47 leté ženy, c.596V>C, V199A u 78 letého muže, c.427G > A, A143T u 70-leté ženy. Dosud v literatuře nepopsanou variantu c89G>A, R30K jsme našli u 83leté ženy.

Pokud vyloučíme patologické varianty, pak průměrný věk 14 pacientů s variantami nejasného významu (VUS) je 63,4 (SD 15,2, rozmezí 41-83), což se statisticky neliší od průměrného věku pacientů bez přítomnosti varianty GLA genu, $p=0,11$. Frekvenční zastoupení patologických variant GLA genu i VUS ve studijní populaci stratifikovaných podle věku a pohlaví ukazuje tabulka 8. Bez ohledu na pohlaví, u pacientů mladších 50 let jsme v našem souboru identifikovali patologickou mutaci u 2,5 % pacientů, varianta nejasného významu byla zastoupena u 5,1 % mladých pacientů s iktem. Naopak, u pacientů starších 50 let jsme nenalezli žádnou patologickou mutaci GLA genu. Dále jsme porovnali zastoupení VUS v kohortě našich pacientů s iktem s dostupnými daty u běžné populace evropského původu. Nepozorovali jsme žádný signifikantní rozdíl (tabulka 9).

Tabulka 8: Frekvence variant genu GLA ve studované populaci stratifikované podle pohlaví a věku

	Celá kohorta	Ženy	Ženy 0-49 let	Ženy 50+ let	Muži	Muž 0-49 let	Muži 50+ let
Počet (% celé kohorty)	986 (100)	450 (45,6)	33 (3,3)	417 (42,4)	536 (54,4)	46 (4,7)	490 (49,6)
Patologické varianty (% kohorty)	2 (0,2)	1 (0,2)	1 (3,0)	0	1 (0,2)	1 (2,2)	0
VUS či benigní varianty (% kohorty)	14 (1,4)	9 (2,0)	3 (9,1)	6 (1,4)	5 (0,9)	1 (2,2)	4 (0,8)
Vysvětlivky: VUS = varianty nejasného významu							

Tabulka 9: Varianty považované za benigní nebo s nejasným klinickým významem zjištěné v naší studii a jejich četnost v populaci

Varianta	dsSNP identifikátor	Počet variant v naší kohortě (n=986)	Frekvence alely u varianty v naší kohortě	Frekvence alely v běžné populaci	Velikost vzorku pro populační frekvenci	P-hodnota mezi skupinami
c.89G>A (p.R30K)	Neuvedeno v dbSNP	1	0,001	0,0000839 [#]	n.a. [#]	0,085
c.112A>G (p.R38G)	rs7308804 46	1	0,001	0,0001399 [#]	n.a. ^{#*}	0,128
c.352C>T (p.R118C)	rs1481580 93	1	0,001	0,00052*	79354*	0,406
c.427G>A (p.A143T)	rs1048948 45	1	0,001	0,00101*	81358*	1,000
c.596T>C (p.V199A)	rs7818711 13	1	0,001	0,0002*	6062*	0,186
c.937G>T (p.D313Y)	rs2893549 0	9	0,0091	0,00554*	81344*	0,130

Vysvětlivky:
Údaje o frekvenci podle *ALFA: Allele Frequency Aggregator. Národní centrum pro biotechnologické informace, Národní lékařská knihovna USA, evropská data (Phan L, 2020), [#] Cento LSD databáze (<https://www.centogene.com/centolsd.html>), navštíveno 12.12.2020
dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database of Nucleotide Sequence Variation (Databáze variací sekvence nukleotidů, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)
n.a. = neuvedeno, nedostupné (not available)

4.2 Druhý tematický okruh

4.2.1 Cerebrovaskulární fenotyp u pacientů s Fabryho chorobou hodnocený pomocí ultrazvuku

Základní demografické a klinické údaje 65 pacientů s FCh a 65 zdravých subjektů, kteří se účastnili studie případů a kontrol, jsou uvedeny v tabulce 10.

Cévní parametry

Průměry a standardní odchylky zkoumaných vaskulárních parametrů (cIMT, dVA, Vmb, BHI, BHIvar, PI) cév zásobujících mozek jsou uvedeny v tabulce 11, a to dohromady pro studovanou populaci a také zvlášť pro každé pohlaví. Tabulka 11 dále zobrazuje výsledky jednoduchých a vícerozměrných lineárních regresí hodnotících vliv přítomnosti FCh na vaskulární parametr buď nekorigovaný, nebo korigovaný na kovariáty. Dále, obrázek 6 ukazuje pozorované výsledky s ohledem na věk, rozděleně podle přítomnosti Fabryho choroby a podle pohlaví.

Tabulka 10: Základní demografické a klinické charakteristiky souboru v neurosonologické studii případů a kontrol

	Pacienti s FCh			Kontroly			Srovnání pacientů a kontrol		
	Průměr (SD) nebo n (%)			Průměr (SD) nebo n (%)			Statistický test, p-hodnota		
	Všichni (n=65)	Muži(n =27)	Ženy (n=38)	Všichni (n=65)	Muži (n=27)	Žen (n=38)	Mezi všemi	Mezi muži	Mezi ženami
Věk (roky)	47,37 (12,75)	47,56 (12,02)	47,24 (13,40)	47,62 (12,65)	47,78 (12,00)	47,50 (13,25)	T ₁₂₈ =0,11 0,9122	T ₅₂ =0,07 0,9461	T ₇₄ =0,09 0,9316
Výška cm)	169,85 (9,63)	178,41 (5,95)	163,76 (6,63)	173,95 (7,74)	179,81 (5,97)	169,79 (5,97)	T₁₂₈=2,68 0,0083	T ₅₂ =0,87 ,3898	T₇₄=4,17 0,0001
Hmotnost (kg)	76,46 (15,33)	84,26 (15,96)	70,92 (12,32)	77,55 (14,04)	82,85 (11,37)	73,79 (14,71)	T ₁₂₈ =0,42 0,6716	T ₅₂ =-0,37 0,7105	T ₇₄ =0,93 0,3560
BMI	26,44 (4,40)	26,42 (4,50)	26,46 (4,39)	25,63 (4,36)	25,67 (3,70)	25,60 (4,82)	T ₁₂₈ =-1,06 0,2923	T ₅₂ =-0,67 0,5084	T ₇₄ =-0,81 0,4192
TKs (mm/Hg)	123,4 (17,1)	126,7 (17,7)	121,0 (16,4)	129,8 ^d (16,9)	133,2 ^b (14,0)	127,3 ^c (18,5)	T₁₂₄=2,12 0,0362	T ₅₁ =1,46 0,1492	T ₇₁ =1,54 0,1292
TKd mm/Hg	80,7 (11,8)	81,6 (12,6)	80,1 (11,3)	83,3 ^d (10,1)	83,8 ^b (10,4)	83,0 ^c (9,8)	T ₁₂₄ =1,35 0,1784	T ₅₁ =0,68 0,4972	T ₇₁ =1,18 0,2382
TF (počet/min)	66,2 (10,6)	64,6 (11,5)	67,3 (9,9)	66,1 ^c (9,2)	63,3 (8,5)	68,3 ^c (9,3)	T ₁₂₅ =-0,04 0,9680	T ₅₂ =-0,45 ,6488	T ₇₁ =0,42 0,6773
Hyperurikmie	14 (21,5%)	9 (33,3%)	5 (13,2%)	1 (1,5%)	1 (3,7%)	0 (0%)	Z=-3,57 0,0004	Z=-2,80 0,0051	0,0543 ^a

Vysvětlivky: FCh=Fabryho choroba; BMI=body mass index; TKs=systolický krevní tlak; TKd=diastolický krevní tlak; TF=tepová frekvence; CHRI=chronická renální insuficience; DM=diabetes mellitus; CMP=cévní mozková příhoda; TIA=transientní ischemická ataka; ICHS=ischemická choroba srdeční;
 Spojité proměnné byly analyzovány pomocí dvouvýběrového t-testu se stejnými rozptyly a binární proměnné byly analyzovány pomocí dvouvýběrového proporčního z-testu, pokud očekávané hodnoty pro alespoň 1 buňku nebyly < 5, pak byl použit Fisherův exaktní test, P-hodnoty menší než 5 % jsou vyznačeny tučně,
^a Fisherův exaktní test ^b jedno chybějící pozorování ^c tři chybějící pozorování ^d čtyři chybějící pozorování

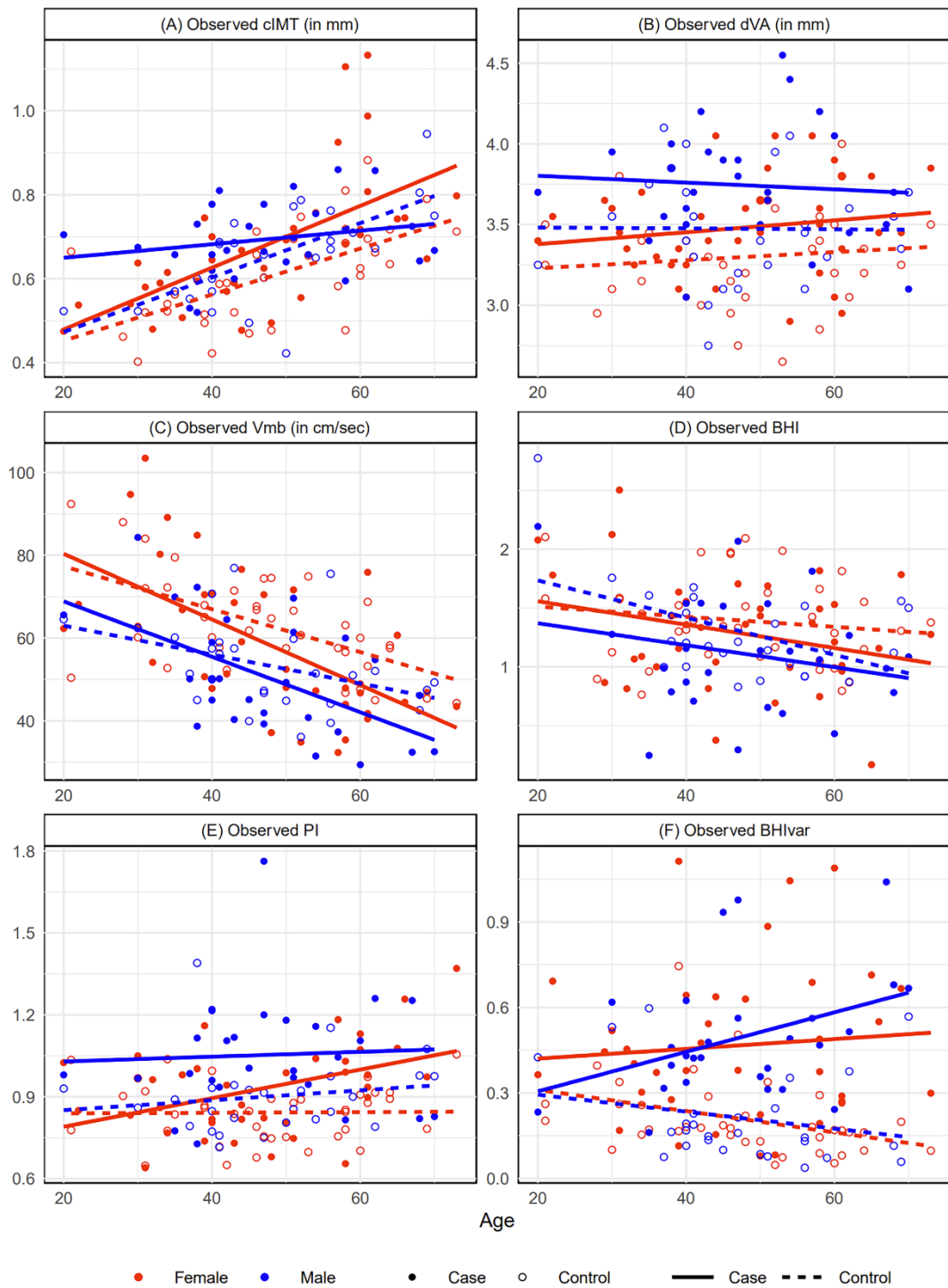
Tabulka 10 – pokračování: Základní demografické a klinické charakteristiky souboru v neurosonologické studii případů a kontrol

	Pacienti s FCh			Kontroly			Srovnání pacientů a kontrol		
	Průměr (SD) nebo n (%)			Průměr (SD) nebo n (%)			Statistický test, p-hodnota		
	Všichni (n=65)	Muži(n =27)	Ženy (n=38)	Všichni (n=65)	Muži (n=27)	Žen (n=38)	Mezi všemi	Mezi muži	Mezi ženami
Aktivní kouření	18 (27,7%)	8 (29,6%)	10 (26,3%)	8 (12,3%)	2 (7,4%)	6 (15,8%)	Z=-2,19 ,0283	Z=-2,10 ,0356	Z=-1,13 ,2604
CHRI	18 (27,7%)	12 (44,4%)	6 (15,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	Z=-4,57 <,0001	Z=-3,93 ,0001	,0253 ^a
DM	4 (6,2%)	4 (14,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	,1192 ^a	,1110 ^a	—
Hypertenue	25 (38,5%)	14 (51,8%)	11 (28,9%)	9 (13,8%)	3 (11,1%)	6 (15,8%)	Z=-3,19 ,0014	Z=-3,22 ,0013	Z=-1,38 ,1687
Dyslipidémie	28 (43,1%)	14 (51,8%)	14 (36,8%)	7 (10,8%)	5 (18,5%)	2 (5,3%)	Z=-4,15 <,0001	Z=-2,56 ,0103	Z=-3,38 ,0007
CMP/TIA	9 (13,8%)	3 (11,1%)	6 (15,8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	,0029 ^a	,2358 ^a	,0253 ^a
ICHS	4 (6,1%)	0 (0%)	4 (10,5%)	1 (1,5%)	1 (3,7%)	0 (0%)	,3652 ^a	1,0000 ^a	,1151 ^a
Fibrilace síní	6 (9,2%)	6 (22,2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	,0277 ^a	,0229 ^a	—
Migréna	7 (10,8%)	2 (7,4%)	5 (13,2%)	6 (9,2%)	1 (3,7%)	5 (13,2%)	Z=-0,29 ,7700	1,0000 ^a	Z=0,00 1,0000
Hyperurikmie	14 (21,5%)	9 (33,3%)	5 (13,2%)	1 (1,5%)	1 (3,7%)	0 (0%)	Z=-3,57 ,0004	Z=-2,80 ,0051	,0543 ^a

Vysvětlivky: FCh=Fabryho choroba; BMI=body mass index; TKS=systolický krevní tlak; TKd=diastolický krevní tlak; TF=tepová frekvence; CHRI=chronická renální insuficience; DM=diabetes mellitus; CMP=cévní mozková příhoda; TIA=transientní ischemická ataka; ICHS=ischemická choroba srdeční;
Spojité proměnné byly analyzovány pomocí dvouvýběrového t-testu se stejnými rozptyly a binární proměnné byly analyzovány pomocí dvouvýběrového porovnávacího z-testu, pokud očekávané hodnoty pro alespoň 1 buňku nebyly < 5, pak byl použit Fisherův exaktní test, P-hodnoty menší než 5 % jsou vyznačeny tučně,
^a Fisherův exaktní test ^b jedno chybějící pozorování ^c tři chybějící pozorování ^d čtyři chybějící pozorování

Tabulka 11: Neurosonologické výsledky u pacientů s Fabryho chorobou a u věkem a pohlavím vázaných kontrol

	Pacienti s FCh			Kontroly			Porovnání bez korekcí			Po korekcích	
	Všichni	Muži	Ženy	Všichni	Muži	Ženy	Mezi všemi	Mezi muži	Mezi ženami	Mezi všemi	Kovariáty
	Průměr (SD), n						Statistický test, p-hodnota				
Strukturální vaskulární charakteristiky											
cIMT (in mm)	0,69 (0,13), 63	0,69 (,19), 26	0,68 (,16), 37	0,63 (0,12), 61	0,65 (0,11), 27	0,61 (0,12), 34	T₁₂₂=2,58 0,0111	T ₅₁ =1,43 0,1583	T₆₉=2,19 0,0318	T₁₁₉=3,27 0,0014	Age: T₁₁₉=7,16, <0,0001 BMI: T₁₁₉=2,00, 0,0478 Sex: T ₁₁₉ =1,73, ,0870
dVA (in mm)	3,59 (0,35), 65	3,74 (0,36), 27	3,48 (0,31), 38	3,38 (0,33), 62	3,47 (0,34), 27	3,30 (0,31), 35	T₁₂₅=3,53 0,0006	T₅₂=2,83 0,0066	T₇₁=2,53 0,0137	T₁₂₂=3,81 0,0002	Age: T₁₂₂=0,73, 0,4645 BMI: T₁₂₂=-0,38, 0,7040 Sex: T₁₂₂=3,78, 0,0002
Hemodynamické charakteristiky											
Vmb (in cm/sec)	55,3 (16,7), 65	50,4 (14,3), 27	58,8 (17,6), 38	59,1 (12,2), 65	53,3 (10,5), 27	63,2 (11,7), 38	T ₁₂₈ =-1,47 0,1447	T ₅₂ =-0,85 0,4009	T ₇₄ =-1,28 0,2055	T ₁₂₅ =-1,95 0,0537	Age: T₁₂₅=-7,35, <0,0001 BMI: T₁₂₅=-0,60, 0,5485 Sex: T₁₂₅=4,26, <0,0001
BHI	1,21 (0,49), 65	1,11 (0,49), 27	1,29 (0,47), 38	1,35 (0,38), 65	1,30 (0,40), 27	1,39 (0,37), 38	T ₁₂₈ =-1,80 0,0736	T ₅₂ =-1,49 0,1415	T ₇₄ =-1,10 0,2752	T₁₂₅=-2,07 0,0409	Age: T₁₂₅=-3,37, 0,0010 BMI: T₁₂₅=1,58, 0,1163 Sex: T ₁₂₅ =-1,79, 0,0751
BHIvar	0,48 (0,25), 64	0,50 (0,22), 27	0,47 (0,27), 37	0,21 (0,14), 65	0,21 (0,16), 27	0,21 (0,13), 38	T₁₂₇=7,56 <0,0001	T₅₂=5,47 <0,0001	T₇₃=5,27 <0,0001	T₁₂₄=7,54 <0,0001	Age: T₁₂₄=-0,20, 0,8386 BMI: T₁₂₄=-0,83, 0,4107 Sex: T ₁₂₄ =0,45, 0,6562
PI	0,98 (0,19), 64	1,06 (0,21), 27	0,93 (0,17), 37	0,87 (0,12), 65	0,90 (0,14), 27	0,84 (0,11), 38	T₁₂₇=4,08 0,0001	T₅₂=3,21 0,0023	T₇₃=2,74 0,0077	T₁₂₄=4,36 <0,0001	Age: T₁₂₄=2,20, 0,0299 BMI: T₁₂₄=-1,01, 0,3166 Sex: T₁₂₄=3,28, %,0013
Vysvětlivky: FCh=Fabryho choroba; cIMT=tloušťka intimo-medie v distální společné karotidě; dVA=průměr vertebrální tepny; Vmb=klidová průtoková rychlost ve střední mozkové tepně; BHI=vazoreaktivita na střední mozkové tepně testem zadrženi dechu, vyjádřená indexem; BHIvar=variabilita vazoreaktivity na střední mozkové tepně; PI = pulzatilní index Neadjustovaná srovnání případů a kontrol byla vypočítána pomocí jednoduchých lineárních regresí pro všechny pacienty a také pro každé z pohlaví, Adjustovaná srovnání případů a kontrol pro všechny subjekty byla vypočítána pomocí vícerozměrné lineární regrese, ve které byl účinek FCh vs, kontrola upraven podle kontinuálních proměnných věku a BMI a binární proměnné pohlaví, P-hodnoty menší než 5 % jsou vyznačeny tučně,											



Obrázek 6: Pozorované neurosonologické výsledné parametry podle věku, dále rozdělené podle pohlaví a přítomnosti Fabryho choroby.

Morfologické změny v tepnách zásobujících mozek –strukturální parametry

Intimomediální tloušťka v distální společné karotidě: obrázek 6(A)

Mezi pacienty s FCh a kontrolní skupinou byl významný rozdíl, a to jak bez korekce, tak po adjustaci na kovariáty. Po adjustaci na věk, BMI a pohlaví měli pacienti s FCh měli v průměru o 0,06 mm větší tloušťku cIMT ve srovnání s kontrolami (T119=3,27, P=0,0014). Ve stejném adjustovaném modelu byl věk významně spojen s rozšířením cIMT (T119=7,16, P<0,0001), což naznačuje, že s každým rokem věku se tloušťka cIMT zvyšuje v průměru o 0,005 mm.

A konečně, při úpravě na kovariáty nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi pohlavími (T118=-0,88, P=0,3819) ve vlivu přítomnosti FCh na cIMT a vliv věku na cIMT se významně nelišil mezi pacienty s FCh a kontrolami (T118=-0,23, P=0,8167).

Šíře vertebrální tepny: obrázek 6(B)

Pacienti s FCh měli významně větší průměr dVA, o 0,21 mm ve srovnání s kontrolami – nekorigovaný model (T125=3,53, P=0,0006). Konkrétně, muži s FCh měli v průměru o 0,27 mm větší dVA a ženy s FCh měly v průměru o 0,18 mm větší dVA ve srovnání s kontrolami. Po korekci na kovariáty zůstal rozdíl v dVA mezi pacienty s FCh a kontrolami významný (b=0,22 mm, T125=3,81, P=0,0002). A konečně, i po korekci pro definované kovariáty, nebyly významné rozdíly ve vlivu FCh na dVA mezi pohlavími (T121=0,76, P=0,4459), a ani vliv věku na dVA se mezi pacienty s FCh a kontrolami významně nelišil (T121 = 0,02, P = 0,9851).

Hemodynamické změny ve střední mozkové tepně – klidová střední průtoková, pulzatilní index a cerebrovaskulární reaktivita (měřeno indexem zadržetí dechu)

Klidová střední průtoková rychlost: obrázek 6(C)

V neadjustovaných analýzách nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v rychlostech průtoku krve mozkem mezi pacienty s FCh a kontrolami, ani po rozdělení podle pohlaví. Nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi jednotlivými měřeními v rámci jednotlivých subjektů a ani se v tomto ohledu nelišili pacienti od kontrol (F=0,80; P=0,497, resp. F=0,156, p=0,926). Po úpravě na věk, BMI a pohlaví byl však vliv přítomnosti FCh na Vmb téměř významný (T128=-1,95, P=0,0537) a naznačuje, že pacienti s FCh mají v průměru o 4,03 cm/s menší rychlost průtoku krve ve srovnání ke

kontrolám. Navíc, po adjustaci analýza ukazuje, že se obecně s každým přibývajícím rokem věku výrazně snižuje rychlost průtoku krve o 0,61 cm/s ($T_{125}=-7,35$, $P<0,0001$), a že muži mají v průměru o 8,92 cm/s menší V_{mb} ve srovnání s ženami ($T_{125}=-4,26$, $P<0,0001$).

A konečně, ani po úpravě na kovariáty, nebyly mezi pohlavími ($T_{124}=0,36$, $P=0,7162$) žádné významné rozdíly v tom, jak přítomnost FCh ovlivňuje V_{mb} . Po úpravě na kovariáty jsme pouze pozorovali trend v rozdílu vlivu věku na V_{mb} mezi pacienty s FCh a kontrolami ($T_{124}=-1,79$, $P=0,0756$). Mezi pacienty s FCh bylo stárnutí o jeden rok významně spojeno s poklesem V_{mb} , v průměru o 0,76 cm/s ($T_{61}=-5,70$, $P<0,0001$), zatímco u kontrol byl vzestup věku o jeden rok významně spojen s poklesem V_{mb} o 0,46 cm/s ($T_{61}=-4,65$, $P<0,0001$).

Cerebrovaskulární reaktivita: obrázky 3 (D&F)

V jednorozměrném modelu jsme nepozorovali rozdíl mezi pacienty s FCh a kontrolami v hodnotách BHI. Po úpravě na kovariáty měli pacienti BHI významně nižší než kontroly ($T_{125}=-2,07$, $P=0,0409$), a to v průměru o 0,15. Kromě toho nebyly žádné významné rozdíly mezi pohlavími ($T_{121}=-0,49$, $P=0,6261$) ve vlivu přítomnosti FCh na BHI, vliv věku na BHI se významně nelišil mezi pacienty s FCh a kontrolami ($T_{121}=-0,16$, $P=0,8714$).

Mezi pacienty s FCh a kontrolami jsme pozorovali významný rozdíl v BHIvar, přičemž pacienti s FCh měli BHIvar o 0,27 vyšší ve srovnání s kontrolami ($T_{127}=7,56$, $P<0,0001$). Konkrétně, muži s FCh měli v průměru o 0,29 bodu větší BHIvar a ženy s FCh měly v průměru o 0,26 bodu větší BHIvar ve srovnání s kontrolami. Po úpravě na kovariáty se rozdíl v BHIvar mezi pacienty s FCh a kontrolami nezměnil ($b=0,27$, $T_{124}=7,54$, $P<0,0001$). A konečně, ani po úpravě kovariáty, nebyly mezi pohlavími ($T_{123}=0,38$, $P=0,7046$) žádné významné rozdíly ve vlivu přítomnosti FCh na BHIvar. Mezi pacienty s FCh a kontrolami však byl významný rozdíl ve vlivu věku na BHIvar ($T_{123}=2,51$, $P=0,0135$). U pacientů s FCh zvýšení věku o jeden rok významně nezměnilo BHIvar ($b=0,0041$, $T_{60}=0,46$, $P=0,6493$), zatímco u kontrol bylo stárnutí o jeden rok významně spojeno s poklesem BHIvar o 0,0037 ($T_{60}=-2,61$, $P=0,0115$).

Pulzatilní index: obrázek 6(E)

V neadjustovaném modelu měli pacienti s FCh v průměru významně větší PI o 0,12 bodu ve srovnání s kontrolami (T127=4,08, P=0,0001). Konkrétně pacienti s FCh měli v průměru o 0,15 bodu větší PI a pacienti s FCh měli v průměru o 0,09 bodu větší PI ve srovnání s kontrolami. Po úpravě na kovariáty se signifikantní rozdíl v PI mezi pacienty s FCh a kontrolami nezměnil (b=0,12, T124=4,36, P<0,0001) a navíc muži měli v průměru vyšší PI o 0,09 ve srovnání se ženami (T124=3,28, P=0,0013). A konečně, mezi pohlavími (T123=1,17, P=0,2429) nebyly žádné významné rozdíly ve vlivu přítomnosti Fabryho choroby na PI, vliv věku se mezi pacienty s FCh a kontrolami se významně nelišil (T123=1,35, P=0,1787).

4.2.2 Prediktory cerebrovaskulárních abnormit v kohortě pacientů s Fabryho chorobou

Základní demografické charakteristiky a klinické údaje 85 pacientů s FCh ukazuje tabulka 12.

Objemy lézí bílé hmoty: 69 (38 žen, průměrný věk 47,69 let; 31 mužů, průměrný věk 49,67 let) z 86 pacientů skupiny B podstoupilo MRI mozku. Průměrný objem WMAs byl 1,82 ml (rozmezí 0,80 - 8,75 ml) u žen a 3,37 ml (rozmezí 1,0 - 16,66 ml) u mužů.

Výsledky jednorozměrné analýzy vlivu jednotlivých klinických, hemodynamických a biochemických faktorů na zkoumané proměnné shrnuje tabulka 12 a, b, c.

Výsledky prediktivních modelů mnohorozměrné analýzy (dopředná kroková metody za účasti vybraných relevantních parametrů) ukazují tabulky 13a a 13b. Hlavními prediktory pro strukturální charakteristiky byly věk a MSSI. Hlavními prediktory pro hemodynamické charakteristiky byly kromě věku a MSSI ještě také pohlaví a tepová frekvence. Pro parametr BHIvar jsme jako jediný signifikantním prediktor identifikovali MSSI skóre. Jak ukazuje plný a post-hoc model na některé vaskulární abnormity mají vliv rovněž klasické cévní rizikové faktory.

Tabulka 12a: Výsledky jednorozměrné analýzy zkoumaných parametrů ve vztahu k vybraným klinickým prediktorům (základní charakteristiky subjektů s Fabryho chorobou), p-hodnoty.

Jednorozměrná analýza, p-hodnoty (r-korelační koeficient)								
		Zkoumané parametry						
		Strukturální vaskulární charakteristiky			Hemodynamické charakteristiky			
	Průměr (SD) nebo %	cIMT n=83	dVA n=82	WMAs n=68	PI n=79	Vmb n=80	BHI n=78	BHIvar n=74
Základní charakteristiky								
Věk (roky) ^a n=85	48,62 (13,87)	< 0,0001 (0,5599)	0,2988 (0,1154)	0,1840 (0,1617)	0,0120/ (0,2800)	< 0,0001 (-0,6286)	0,0030 (-0,3272)	0,2010 (0,1584)
Pohlaví (ženy) ^b n=85	54,11%	0,9521	0,0021	0,0342	0,0045	0,0029	0,0830	0,7749
Fenotyp (klasický) ^b n=85	81,93%	0,5960	0,0316	0,2509	0,8899	0,9003	0,64463	0,3959
Výška (cm) ^a n=84	170,92 (9,45)	0,3270 (-0,1095)	0,0148 (0,2683)	0,148 (0,1772)	0,5670 (0,0659)	0,3060 (-0,1167)	0,4520 (-0,0870)	0,4340 (-0,0978)
Hmotnost (kg) ^a n=84	78,11 (16,28)	0,5010 (0,0754)	0,5220 (0,0781)	0,7720 (-0,0358)	0,2540 (0,1308)	0,2420 (-0,1333)	0,5780 (0,0644)	0,8720 (0,0202)
BMI (kg/m ²) ^a n=84	26,65 (4,61)	0,1040 (0,1809)	0,4210 (-0,0901)	0,2340 (-0,1463)	0,3440 (0,1085)	0,4530 (-0,0856)	0,3280 (0,1129)	0,5410 (0,0766)
Léčba specifickou terapií ^b n=85	48,24%	0,1880 ^a	0,0398	0,0385	0,0698	0,0072	0,9880 ^b	0,2651

^aPearsonova korelační analýza – p, (r); ^b test rozdílu mezi skupinami (t-test)

Tabulka 12b: Výsledky jednorozměrné analýzy zkoumaných parametrů ve vztahu k vybraným klinickým prediktorům (faktory ovlivňující hemodynamiku), p-hodnoty.

Jednorozměrná analýza, p-hodnoty (r – korelační koeficient)								
	Zkoumané parametry							
	Průměr SD nebo %	Strukturální			Hemodynamické			
		cIMT n=83	dVA n=82	WMAs n=68	PI n=79	Vmb n=80	BHI n=78	BHIvar n=74
Prediktory – hemodynamické faktory, p-hodnota								
TKs (mmHg) n=85	124,66 (18,28)	0,7070 (0,0419)	0,8910 (-0,0153)	0,2700 (-0,1346)	0,1710 (0,1554)	0,0670 (-0,2056)	0,1290 (-0,1735)	0,4540 (-0,0930)
TKd (mmHg) n=85	80,40 (11,58)	0,4350 (-0,0869)	0,7506 (0,0354)	0,0670 (-0,2220)	0,7990 (0,02918)	0,0640 (-0,2082)	0,0870 (-0,1950)	0,2370 (-0,1456)
TF (počet/min) n=85	66,47 (0,27)	0,3580 (-0,1021)	0,8434 (-0,0220)	0,4470 (-0,0930)	0,0030 (-0,3281)	0,2680 (0,1254)	0,0180 (-0,2678)	0,3270 (-0,1215)
Hematokrit n=82	0,423 (0,046)	0,0520 (0,2180)	0,2117 (-0,1411)	0,0770 (-0,2178)	0,1620 (0,1622)	0,2620 (-0,1294)	0,0220 (-0,2634)	0,8890 (-0,0179)
TKs = systolický krevní tlak ; TKd = diastolický krevní tlak; TF = tepová frekvence								

Tabulka 12c Výsledky jednorozměrné analýzy zkoumaných parametrů ve vztahu k vybraným klinickým prediktorům (vaskulární rizikové faktory subjektů s Fabryho chorobou), p-hodnoty.

Jednorozměrná analýza								
	Zkoumané proměnné							
	%	Strukturální			Hemodynamické			
		cIMT n=83	dVA n=82	WMAs n=68	PI n=79	Vmb n=80	BHI n=78	BHIvar n=74
Prediktory – vaskulární rizikové faktory, p-hodnot								
HN ^b (n=79)	44,19	0,0131	0,16327	0,0256	0,1230	0,0027	0,2571	0,5479
DL ^b (n=80)	46,51	0,0079	0,7371	0,5688	0,0234	0,0002	0,1218	0,1628
DM ^b (n=79)	6,98	0,8945	0,6153	0,6429	0,1204	0,0181	0,7454	0,3755
Aktivní kouření ^b (n=80)	36,66	0,6234	0,4320	0,1265	0,5508	0,3136	0,5838	0,4087
CMP/TIA ^b n=85	14,29	0,1896	0,2910	0,8291	0,5828	0,8462	0,5012	0,4505
OSA ^b n=83	10,98	0,0934	0,3142	0,3049	0,0934	0,1587	0,9608	0,4251
Prediktory – tíže Fabryho choroby, p-hodnot, korelační koeficient								
MSSI (hodnota) ^a n=85	20,59 (12,66)	0,0010 (0,3572)	<0,0001 (0,3813)	<0,0001 (0,4701)	<0,0001 (0,4431)	<0,0001 (-0,5023)	0,0190 (-0,2642)	0,02403 (0,2757)
^a Pearsonova korelační analýza – p (korelační koeficient r), ^b – p hodnota T-testu, porovnání mezi skupinami HN = hypertenze, DL = dyslipidémie; Dm = diabetes mellitus; CMP/TIA = cévní mozková příhoda/transitorní ischemická ataka; OSA = syndrom spánkové apnoe; MSSI = skóre tíže Fabryho choroba								

Tabula č. 13a – Prediktivní modely a jejich výsledky pro strukturální zkoumané proměnné (šíře intimo-medie v distální společné karotidě (cIMT), šíře vertebrální tepny v úseku V2 (dVA), objemy lézí bílé hmoty na magnetické rezonanci (WMAs))

Parametr	cIMT	dVA	WMAs
Demografický model p, F, R ² , prediktory	<0,00001, 18,4, 32,0% věk*, BMI,	0,0162, 4,4, 10,5% pohlaví*, BMI [§]	0,0224, 3,4, 14,7% pohlaví, BMI [§] , věk*
Plný model p, F, R ² prediktory	0,0001, 6,6, 36,3%, Věk*, pohlaví [#] , BMI, MSSI*, OSA, DM [§]	0,0012, 4,5, 24,2% pohlaví, typ mutace [§] , MSSI*, OS [§] , DL [§]	0,0003, 5,6, 32,5% MSSI*, kouření [§] , DL [§] , BMI [§] , věk
Fabry model p, F, R ² prediktory	<0,00001, 8,85, 37,1% věk*, pohlaví [#] , BMI, typ mutace, MSSI*	0,0006, 6,5, 21,0% pohlaví, typ mutace* [§] , MSSI	0,0006, 5,7, 27,9% MSSI*, typ mutace [§] , BMI [§] , věk
Post-hoc model p, F, R ² prediktory	<0,00001, 19,7, 33,6% věk*, MSSI	0,0001, 7,7, 22,9% pohlaví, typ mutace* [§] , MSSI	0,00003, 24,7, 27,9% MSSI*
Kombinovaný model p, F, R ² prediktory	<0,00001, 8,85, 37,1% věk*, pohlaví [#] , BMI, typ mutace, MSSI*	0,0001, 7,7, 22,9% pohlaví, typ mutace* [§] , MSSI	0,0006, 5,7, 27,9%, MSSI*, typ mutace [§] , BMI [§] , věk
<p>Vysvětlivky: signifikantní prediktor v p<0,05; [#] vyšší hodnoty u žen, [§] negativní korelace BMI = index tělesné hmotnosti; MSSI = Mainz severity score index; OSA = syndrom spánkové apnoe; DL = dyslipidémie;</p> <p>Demografický model – testované prediktory: věk, pohlaví, BMI Plný model – testované prediktory u strukturálních parametrů: věk, pohlaví, BMI, specifická terapie, typ mutace, MSSI, DL, hypertenze, diabetes mellitus, OSA, kouření Fabry model – testované prediktory: věk, pohlaví, BMI, specifická terapie, typ mutace, MSSI Post-hoc model – testovány pouze prediktory signifikantně korelující v předchozí jednorozměrné předchozí Kombinovaný model – prediktory z Fabry modelu a Post-hoc modelu</p>			

Tabulka č. 13b: Prediktivní modely a jejich výsledky pro hemodynamické zkoumané proměnné v arteria cerebri media (pulzatilní index (PI), klidová střední průtoková rychlost (Vmb), index zdržení dechu (BHI), variabilita indexu zdržení dechu (BHIvar))

Parametr	PI	Vmb	BHI	BHIvar
Demografický model p, F, R ² prediktory	0,0077, 5,2, 13,0% pohlaví* , věk*	<0,00001, 24,6, 40,1%, věk* [§] , pohlaví*[#]	0,0062, 4,5, 17,0% pohlaví [#] , věk* BMI	0,2808, 1,2, 19% věk
Plný model p, F, R ² prediktory	0,0014, 5,0, 22,6% BMI, MSSI* , DL, kouření [§]	<0,00001, 10,8, 49,1% věk* [§] , MSSI*[§] , DM [§] , DL [§] , HT [§] , kouření	0,0297, 2,4, 21,4% pohlaví*[#] , věk* [§] , BMI, terapie, mutace, HT, kouření [§]	0,0906, 1,9, 19,3% MSSI* , pohlaví [#] , OS [§] , BMI, DL, DM [§] , kouření [§]
Fabry model p, F, R ² prediktory	0,0008, 6,2, 21,3% BMI, MSSI* , věk	<0,00001, 18,5, 44,2% věk [§] , MSSI*[§] , pohlaví [#]	0,0134, 3,1, 19,8% pohlaví [#] , věk* [§] , BMI, terapie, mutace	0,0688, 2,8, 8,5% MSSI*, pohlaví [#]
Post-hoc model p, F, R ² prediktory	0,00007, 8,4, 26,9% MSSI* , TF*[§] , věk	<0,00001, 12,8, 48,6% věk* [§] , MSSI*[§] , DM [§] , DL [§] , HT [§]	0,0034, 5,0, 18,6% MSSI*[§] , TF*[§] , HTC [§]	0,0590, 3,7, 5,7% MSSI
Kombinovaný model p, F, R ² prediktory	0,00007, 8,5, 26,9% MSSI* , TF*[§] , věk	<0,00001, 12,8, 48,6% věk* [§] , MSSI*[§] , DM [§] , DL [§] , HT [§]	0,0028, 3,6, 29,7% MSSI [§] , TF*[§] , HTC [§] , věk* [§] , pohlaví [#] , BMI*, terapie	0,0688, 2,8, 8,5% MSSI* , pohlaví [#]
Vysvětlivky: *signifikantní prediktor v p<0,05, # vyšší hodnoty u žen, § negativní korelace BMI = index tělesné hmotnosti; MSSI = Mainz severity score index; OSA = syndrom spánkové apnoe; DL = dyslipidémie, HT = hypertenzní nemoc; DM = diabetes mellitus, HTC = hematokrit Testované prediktory: Demografický model – věk, pohlaví, BMI; Plný model – věk, pohlaví, BMI, specifická terapie, typ mutace, MSSI, DL, HT, DM, OSA, kouření; Fabry model – věk, pohlaví, BMI, specifická terapie, typ mutace, MSSI. Post-hoc model – testovány pouze prediktory signifikantně korelující v jednorozměrné předchozí analýze Kombinovaný model – Prediktory z Fabry modelu a Post- hoc modelu				

5. Diskuze

5.1 První tematický okruh

5.1.1 Stanovení prevalence Fabryho choroby u pacientů s akutní CMP v České republice. Podrobné fenotypové charakteristiky GLA variant identifikovaných v rámci celostátního screeningu pacientů s cévní mozkovou příhodou v České republice.

Fabryho choroba je vzácné geneticky vázané onemocnění, které má často neurologické projevy. Příznaky z oblasti CNS patří vedle kardiálního a renálního postižení mezi významné faktory určující morbiditu a mortalitu pacientů s tímto onemocněním. Vzhledem k tomu, že je dostupná specifická terapie této nemoci, je včasná diagnostika onemocnění zcela zásadní. Jedním z přístupů, jak diagnostikovat FCh včas je aktivní vyhledávání nemocných v rizikových skupinách, například mezi pacienty s CMP.

Výskytem FCh v populaci pacientů s CMP se zabývají různí autoři již od roku 2005. (Rolfs et al., 2005). Detailní popisy jednotlivých fenotypů nalezených GLA variant však v literatuře chybí. Vzhledem k tomu, že úvodní špatná interpretace genetické varianty může mít výrazný dopad na velkou skupinu pacientů, doplnili jsme naši prospektivní epidemiologickou screeningovou studii u neselektovaných pacientů s iktem o detailní rozbor fenotypu nemocných. Spolu s podrobným vyšetřením možných orgánových manifestací nemoci také u rodinných příslušníků a s přispěním obecně známých a literárních charakteristik genotyp-fenotyp, hodnot aktivity enzymu u nositelů variant a hodnot biomarkeru choroby lysoGb3 jsme zařadili námi nalezených 8 variant do kategorií: varianta patologická, VUS či benigní varianta. Naše screeningová studie odhalila přítomnost Fabryho choroby u 0,2 % pacientů. Toto frekvenční zastoupení je srovnatelné s prevalencí 0,13 % u mužů a 0,14 % u žen udávané v literatuře (Doheny et al., 2018). Stejně tak se od literárních údajů neliší námi pozorovaná prevalence VUS v naší kohortě – 0,9 % u mužů a 1,4 % u žen (0,54 % u mužů a 0,96 % u žen) (Doheny et al., 2018).

Výhodou naší studie v porovnání s dříve publikovanými pracemi je inkluze všech pacientů s iktem, bez omezení věku, pohlaví a typu iktu. Naše kohorta obsahovala 907 pacientů starších 50 let. Dokonce 25 % pacientů bylo starších 79 let. Doposud pouze 3 screeningové studie zahrnovaly pacienty bez horního věkového omezení. Dvě z nich byly provedeny v Japonsku. Práce Nakamury et al. (2014) testovala pouze muže

s průměrným věkem 69,7+-12,5 let, Nagamatsu et al. (2017) testovali obě pohlaví, průměrný věk ve sledované populaci byl 74,11-12,5 let. V evropské populaci pouze jedna studie, Marquardt et al. (2012) hodnotila prevalenci FCh u pacientů s iktem starších 60 let. Průměrný věk kohorty byl 73,2 let, 85 % pacientů v této kohortě bylo starších 60 let, což je plně srovnatelné s naším souborem, kde 81,2 % pacientů (801) bylo starších 60 let.

Klinicky významným nálezem plynoucí z naší práce je fakt, že dosud nedagnostikované patologické varianty GLA genu se pravděpodobně u starších pacientů s iktem vyskytují vzácně. Jak již dříve bylo zmíněno, oba naši pacienti s patologickou variantou prodělali iktus v mladém věku, byli mladší než 50 let. Pacienti mladší 50 let jsou také obecně nejvíce zkoumanou věkovou skupinou (ve smyslu možné FCh jak příčiny CMP). Na základě našeho pozorování se domníváme, že není nutné rutinně testovat pacienty s iktem starší 50 let za účelem vyloučení FCh jako možné příčiny mozkové příhody.

Dalším zajímavým zjištěním našeho projektu je relativně časté zastoupení GLA varianty D313Y. I když pozorované frekvence v naší kohortě (0,9 %, celkem u 9 pacientů) se signifikantně neliší od zastoupení této varianty genu v evropské populaci (0,5 %) (Phan L, 2020) (tabulka 9) pozorovali jsme trend k vyššímu zastoupení u naší studované populace pacientů s iktem. To může naznačovat spojitost mezi přítomností této varianty a rizikem vzniku CMP. Průměrný věk našich devíti pacientů (5 žen, 4 muži) s variantou D313Y byl 59,1 let. Žádný z těchto pacientů neměl zvýšený biomarker lysoGb3. Žádný z pacientů, u kterých byla změřena aktivita α -GAL A, neměl aktivitu enzymu <35 %.

Fenotypové charakteristiky nalezených variant

Obě nalezené patogenní varianty (G325S, T412Sfs*?) byly popsány v literatuře již dříve. Varianta G325S byla vedena jako late-onset, zatímco o T412Sfs*? bylo známo, že způsobuje klasický fenotyp (Fabry Gen-Phen database, 2020). Na základě informací získaných z podrobného vyšetření pacientů 1.0 a 1.1 jsme dospěli k závěru, že varianta G325S by mohla vést ke klasickému fenotypu, ačkoli první pozorovaný klinický projev u indexového pacienta (1.0) se objevil až v dospělosti. Navíc naše Fabryho centrum navštěvuje 56letý pacient s mutací G325S, u kterého se projevuje široké spektrum příznaků klasického fenotypu již od dětství.

U varianty G325S je k dispozici pouze několik publikovaných údajů o biochemickém a klinickém fenotypu. Lukas a kol. uvedli biochemickou fenotypovou charakteristiku produktu mutovaného genu, jeho farmakologickou reaktivitu na chaperony a popsali zvýšenou hladinu lysoGb3, což naznačuje, že tato varianta je klinicky patogenní (Lukas et al., 2013; Lukas et al., 2020). Do studie Kokotise a kol. (2018) hodnotící inervaci potních žláz byl zařazen pacient s variantou G325S. Podrobnější popis fenotypu pacienta však autoři neuvedli.

V době stanovení diagnózy vykazoval náš pacient s variantou G325S biochemicky nízkou aktivitu enzymu a vysoké hladiny lysoGb3. Podrobné vyšetření odhalilo celé spektrum oční patologie, neuropatii tenkých nervových vláken (ačkoli pacient neuváděl žádné senzorycké příznaky) a závažné orgánové komplikace. Skutečnost, že pacient s FCh, který vykazuje při funkčních a strukturálních vyšetřeních jasnou přítomnost neuropatie tenkých vláken neuvádí ani na cíleně kladené dotazy pro FCh typické bolestivé epizody neuropatické bolesti, je velmi důležitá a může vést k chybné klasifikaci varianty, popřípadě k opožděnému stanovení správné diagnózy.

Ve srovnání s G325S se klinické popisy fenotypu T412Sfs*? v literatuře objevují častěji. Je známo, že varianta je spojena s klasickým fenotypem nemoci. V naší studii klinické příznaky pacientky 2.0 spolu s typickými bolestivými krizemi, které se objevily u jejího 12letého syna, potvrzují patogenitu varianty spojenou s klasickým fenotypem FCh.

Rovněž nález lehké pleiocytózy při vyšetření mozkomíšního moku pacientů s patogenní variantou je zajímavý. U pacientů s FCh nebývá mozkomíšní mok běžně analyzován. Již od roku 1985 jsou však v literatuře sporadicky popisovány případy „aseptické“ či „chronické“ meningitidy u pacientů s touto nemocí (Dubost et al., 1985). U nemocných byla opakovaně popsána v likvorologických nálezech lehká až středně významná pleiocytóza odpovídající nálezům při aseptické meningitidě, u některých pacientů i s doprovodnou bolestí hlavy. Současně s pleiocytózou byl reportován nález lakunárních iktů, dominantně v zadním povodí (Dubost et al., 1985; Uyama et al., 1995; Schreiber et al., 2007; Lidove et al., 2009), což je v souladu s nálezy u pacientů s patogenní variantou v našem souboru. Na rozdíl od pacientů s FCh a iktem, u pacientů s CMP bez FCh nebývá pleiocytóza běžně detekována, i když velmi lehký vzestup elementů v mozkomíšním moku může být přítomen

(Schulte-Mecklenbeck et al., 2019). Protože aseptická meningitida je vzácnou fenotypovou manifestací FCh, nález zvýšeného počtu buněk v mozkomíšním moku může být zavádějícím při stanovování správné diagnózy. Nicméně, jak ukazují naše nálezy, po vyloučení zánětlivých onemocnění CNS, spojení lakunárního iktu s nálezem pleiocytózy v mozkomíšním moku u mladého pacienta by vždy mělo vést k podezření na FCh.

V odborné veřejnosti již řadu let probíhá diskuze ohledně patogenity a fenotypové manifestace několika VUS, včetně variant nalezených v naší kohortě R118C, A143T a D313Y.

Varianta R118C byla primárně identifikována při novorozeneckém screeningu v roce 2004 (Ferreira et al., 2015). Na základě biochemických charakteristik enzymu bylo usuzováno na fenotyp FCh s pozdějším nástupem (Spada et al., 2006). Zpočátku byla tato varianta považována za patogenní, což vedlo k jejímu zařazení do výpočtů prevalence FCh při screeningu mladých pacientů s CMP (Rolfs et al., 2013). Později byla varianta překlasifikována na VUS (Ferreira et al., 2015) ačkoli v poslední době se objevují informace, které hovoří ve prospěch původní klasifikace (Talbot a Nicholls, 2019).

Varianta A143T byla poprvé popsána v roce 1997 Engem et al., kteří tuto variantu identifikovali u dvouměsíčního dítěte. Biochemický fenotyp ukázal sníženou aktivitu α -GAL A jak u probanda, tak u jeho matky. Klinický fenotyp u kojence nebylo možné vyhodnotit, jeho matka nevykazovala žádné známky FCh. Stejně tak rodinní příslušníci neměli v anamnéze projevy FCh. Autoři tak nemohli variantu z hlediska patogenity zařadit (Eng et al., 1997). Později Spada et al. (2003) předpokládali, že genotyp A143T je spojen s nefropatií a renálním selháním (renální varianta). Od té doby byla A143T klasifikována jako tzv. late-onset patogenní varianta (Nance et al., 2006; Spada et al., 2006). Za patogenní byla považována rovněž u pacientů s CMP, u kterých byla identifikována ve rámci screeningových studií (Wozniak et al., 2010). Z biochemického hlediska bylo opakovaně prokázáno, že nositelé varianty exprimují sníženou aktivitu α -GAL A. Nižší aktivita byla demonstrována jak při stanovování in vitro, tak a/nebo při analýze plazmy či leukocytů (Nance et al., 2006; Spada et al., 2006). Později, s postupně získanými klinickými informacemi, došlo k přehodnocení patogenity varianty (Smid et al., 2015), a přestože je klinický význam varianty stále

předmětem diskuzí, je v současnosti považována za VUS nebo pravděpodobně benigní variantu (Doheny et al., 2018).

V našem souboru jsme identifikovali dvě ženy (pacientky 3.0, 3.1) s variantou R118C a dvě s variantou A143T (pacientka 4.0. a 4.1). Klinické projevy pacientek byly nespecifické a nezávažné (viz tabulka 5). U jedné z pacientek (3.1) jsme zaznamenali časově omezenou epizodu paroxysmálních neuropatických bolestí, podobnou těm, které se u pacientů s FCh vyskytují. Hodnoty aktivity α -GAL A, a to jak v plazmě, tak v leukocytech, měla pacientka nižší ve srovnání s průměrnou aktivitou enzymu, kterou vykazuje naše kontrolní skupina heterozygotních žen s FCh (údaje pocházejí z naše dlouhodobého sledování). Bohužel jsme nezískali souhlas s podrobným vyšetřením u příbuzných mužského pohlaví pacientky 3.0. U A143T nebyli v blízké rodině žádní žijící muži. Navíc pacientka 4.1. nedokončila vyšetření z důvodu pandemie Covid-19.

Stejně tak klinický význam varianty D313Y se stal předmětem kontroverzí od doby, kdy byla poprvé popsána (Eng et al., 1993) zejména poté, co byla ve stejné alele u pacienta s typickou formou FCh zjištěna duplicitní missense varianta GLA (Guffon et al., 1998; Yasuda et al., 2003). Vysoká reziduální aktivita enzymu D313Y a její závislost na pH (což vede k pseudodeficitu aktivity enzymu v plazmě (Oder et al., 2016)), normální hodnoty lysoGb3 (Niemann et al., 2013; Hasholt et al., 2017) a případy bez klinických projevů (Oder et al., 2016; Hasholt et al., 2017) však ukazují na to, že D313Y je nejspíše benigní variantou.

Fenotypizace v naší kohortě pacientů s D313Y odhalila u dvou jedinců příznaky, které by bylo možno přičíst případné FCh (tabulka 6). U pacienta 11.0 se vyskytovala cornea verticillata a pacient 13.1 trpěl neuropatickou bolestí. Po podrobném vyšetření byla u pacienta 13.1. diagnostikována celiakie. Neuropatickou bolest lze tedy vysvětlit glutenovou neuropatií (Hadjivassiliou et al., 2006). Naopak u pacienta 11.0 jsme jasné vysvětlení pro oční nález, cornea verticillata, nenalezli. Ačkoli některé údaje z in vitro pozorování naznačují potenciální riziko amlodipinu (Muehlbacher et al., 2012), který pacient užíval, klinický výskyt cornea verticillata ve spojení s tímto preparátem nebyl nikdy popsáno.

Obecně lze říci, že klinický význam některých variant, které většina odborníků v současné době považuje za pravděpodobně benigní, zejména R118C, A143T a D313Y, je již léta předmětem diskuzí a jejich souvislost s FCh stále vyvolává řadu otázek.

Absence detekovatelné akumulace lipidů (negativní biopsie ledvin, srdce) zařazení mezi nepatogenní varianty silně podporuje. Nicméně vyšší koncentrace nemetabolizovaného substrátu, která ještě nevede k tvorbě detekovatelných inkluzí, již může ovlivnit rovnováhu biochemických procesů v buňce. Snížená aktivita enzymů, která za fyziologických podmínek postačuje pro metabolické procesy, již nemusí být dostatečná v situacích se zvýšenými nároky na metabolický obrat glykosfingolipidů. Hypoteticky může částečná a/nebo intermitentní blokáda katabolické dráhy s následnou akumulací Gb3 změnit tok metabolitů s dopadem na další biochemické procesy v buňce (např. redistribuci glykosfingolipidů v jiných subcelulárních okrscích) (Askari et al., 2007; Grassi et al., 2019) aniž by došlo k tvorbě typických inkluzí. Hypoteticky by tedy mohla existovat možnost, že přechodné, záchvatovité pálivé bolesti nohou u pacientky 3.1 s variantou R118C v období silného stresu mohou souviset s variantou GLA. Kromě toho je třeba si uvědomit, že aktivitu α -GAL A (jak v plazmě, tak v leukocytech) stanovujeme laboratorně (tedy měříme aktivitu v podmínkách in vitro). Katalytická aktivita α -GAL A in vivo může být odlišná a může vykazovat variabilitu mezi jednotlivými buňkami (Zotter et al., 2017). Navíc, recentně byla jako důležitý faktor, který přispívá k patogenezi FCh identifikována defektní proteostáza (označená termínem AGALopatie) mutované α -GAL A, která vede k chronickému stresu endoplazmatického retikula a odpovědi buněk exprimujících α -GAL A na abnormální sekundární strukturu proteinu (unfolded protein response). Tato zjištění nejenže mohou poskytnout nový vhled do mechanismů, kterými některé varianty způsobují late-onset fenotyp FCh, ale mohly by případně vysvětlit některé z klinických projevů nositelů VUS (Živná et al., 2022).

Mnoho dalších geneticko-biochemicko-environmentálních interakcí může vést k tomu, že benigní varianta či VUS u konkrétního jedince se může za určitých chovat jako rizikový faktor přispívající k orgánovým projevům (např. CMP). Navíc, v některých případech, u nositelů VUS bylo strádání dokonce i popsáno (Koulousios et al., 2017; Talbot a Nicholls, 2019).

Na druhou stranu, vícevrstvé celulární inkluze mohou být způsobeny i tzv. léky indukovanou fosfolipidózou (drug-induced phospholipidosis, DIP). Je známo, že některé léky vedou k lyzozomálnímu strádání a ke klinickým projevům, které připomínají klinické projevy FCh, jako je např. cornea verticillata (Chew et al., 1982; Raizman et al., 2017). Příkladem takových léků jsou amiodaron a aminoachinolony.

Potenciál DIP byl in vitro prokázán také u běžně užívaného karvedilolu a amlodipinu, avšak jejich souvislost s cornea verticillata, jak již uvedeno výše, není známa (Muehlbacher et al., 2012). U jedinců, kteří jsou nositeli varianty genu GLA a mají cornea verticillata je vždy nezbytná podrobná farmakologická anamnéza (van der Tol et al., 2014). V našem souboru se cornea verticillata projevila u všech pacientů s patologickou variantou, včetně dětí. Mezi ostatními jedinci se pacient 6.1 (R30K) prezentoval velmi subtilním nálezem, který vyžaduje další sledování oftalmologem.

5.2 Druhý tematický okruh

5.2.1 Cerebrovaskulární fenotyp u pacientů s Fabryho chorobou. Prediktory cerebrovaskulárních abnormalit v kohortě pacientů s Fabryho chorobou

Přestože CMP jsou známým klinickým neurologickým projevem FCh, patofyziologické mechanismy resultující v CMP u nemocných s FCh jsou komplexní a nejsou dosud zcela objasněny.

V naší studii případů a kontrol, ve které srovnáváme u vybrané strukturální a hemodynamické vaskulární parametry u pacientů s FCh se stejnými parametry u skupiny subjektů bez FCh, jsme ukázali, že některé z vaskulárních abnormalit potenciálně přispívajících ke vzniku CMP, lze detekovat pomocí běžného ultrazvukového vyšetření. Analýzou skupiny nemocných s FCh jsme pak následně identifikovali faktory, které mohou být s vaskulárním postižením pacientů s FCh asociovány. V této kohortě jsme navíc hodnotili prediktory strukturálních změn bílé hmoty na MRI mozku.

Morfologické změny v extrakraniálních tepnách zásobujících mozek – intimomediální tloušťka v distální karotidě, šíře vertebrální tepny

Intimomediální tloušťka

Naše výsledky ukazují, že věkově vázaný vzestup šířky cIMT je přítomen jak u pacientů s FCh, tak u kontrolní skupiny. S věkem stoupající šíře intimo-medie je známá (van den Munckhof et al., 2018). Odhadovaný roční vzestup tloušťky cIMT pozorovaný v našem souboru (0,005 mm) je podobný jako u publikovaných studií (van den Munckhof et al., 2018). Navíc jsme však pozorovali širší cIMT ve skupině pacientů. Rozšíření intimo-medie velkých a středních tepen u pacientů s FCh byl

opakovaně popsán (Boutouyrie et al., 2002; Barbey et al., 2006a; Rombach et al., 2012). V naší práci jsme dříve publikované výsledky zreprodukovali. Analýzou kohorty pacientů s FCh jsme jako hlavní prediktory rozšíření cIMT identifikovali kromě věku také celkovou závažnost nemoci hodnocenou pomocí MSSI. Obecně v rozšíření cIMT mohou hrát roli Fabry-specifické mechanismy, primárně iniciované ukládáním nemetabolizovaných glykosfingolipidů v endotelu cévní stěny a hladkých svalových buňkách tunica media (Germain, 2010)

Šíře vertebrální tepny

Pokud je nám známo, naše studie je první, která hodnotila strukturální změny (ve smyslu rozšíření) vertebrálních tepen u pacientů s FCh. Obecně byl u pacientů s FCh opakovaně prokázáno rozšíření jak extrakraniálních (Vujkovic et al., 2021), tak intrakraniálních mozkových tepen, zejména v zadní cirkulaci (Fellgiebel et al., 2009; Fellgiebel et al., 2011; Uçeyler et al., 2014; Manara et al., 2017). Naše výsledky ukazují na podobné změny, ale v extrakraniálním segmentu vertebrálních tepen. Rozšíření vertebrálních tepen jsme pozorovali jak u mužů, tak u žen a toto rozšíření nebylo signifikantně rozdílné mezi pohlavími, což je rozdíl oproti autorům Manara et al. (2017) či Uçeyler et al. (2014), kteří referovali rozšíření arteria basilaris a/nebo arteria cerebri posterior pouze u mužů. Na rozdíl od nás však měřili šíři tepen pomocí MRI, zatímco my jsme použili sonografické hodnocení. Použití sonografie je v rutinní klinické praxi dostupnější a lze takto vyšetřit i pacienty s kontraindikacemi k provedení MRI. Nicméně klinické implikace našeho nálezu budou cílem dalšího zkoumání. V kohortě pacientů s FCh se jako možný prediktor jevila intenzita nemoci MSSI, dále rovněž v menší míře může podíle i vliv pohlaví (vyšší hodnoty u žen) a přítomnost kardiospecifických mutací. Celkově se tedy jedná opět o silnou vazbu na samotnou Fabryho nemoc.

Hemodynamické změny ve střední mozkové tepně – klidová střední průtoková rychlosti, cerebrovaskulární reaktivita, pulzatilní index

Střední průtoková klidová rychlost

V naší práci jsme neprokázali signifikantní rozdíly v průměrných průtokových rychlostech v ACM mezi pacienty s FCh a kontrolami, což je v souladu s jinými publikovanými studiemi případů a kontrol (Hilz et al., 2004; Uçeyler et al., 2012; Segura et al., 2013). Pozorované Vmb v ACM v naší studii byly nepatrně vyšší, než

v souborech Hilz et al. (2004) či Uçeyler et al. (2012) a lehce nižší, než v práci Segury et al. (2013). Diskrepance mohou být částečně vysvětleny heterogenitou zkoumaných skupin (například přítomnost a délka podávání specifické terapie, průměrný věk skupin, přítomnost faktorů ovlivňujících hemodynamické parametry – hodnota hematokritu, srdeční selhání aj.). Roli mohou hrát také metodologické faktory (například předchozí vyloučení případné extrakraniální patologie v karotickém řečišti, pozice vyšetřovaného (vsedě vs. vleže), použití úhlové korekce při měření průtokových rychlostí (tj. použití TCD či TCCS) (Hilz et al., 2004; Uçeyler et al., 2012; Segura et al., 2013).

Možný vliv terapie zkoumali Moore et al. (2002a). Autoři prokázali vyšší střední průtokové rychlosti v ACM u pacientů s FCh – mužů bez specifické léčby v porovnání se zdravými jedinci a pokles těchto zvýšených průtoků po nasazení ERT. Na druhé straně Segura et al. (2013) nepozorovali žádný rozdíl v průtokových rychlostech v mozkových tepnách u pacientů s FCh v porovnání se zdravými kontrolami bez ohledu na věk, tíži nemoci (kterou hodnotili pomocí renálních parametrů) či změny v průtokových charakteristikách během ERT.

V naší práci jsme pozorovali rozdíly v průtokových rychlostech mezi muži a ženami obecně (jak u pacientů s FCh, tak u zdravých dobrovolníků), což je v souladu s recentně publikovanými daty, která ukazují, že ženy mají vyšší průtokové rychlosti než muži, ale strmější pokles křivky průtokových rychlostí s věkem. (Alwatban et al., 2021).

Podobně jako je již známo z literatury (Bertsch et al., 2009; Peisker et al., 2010; Alwatban et al., 2021), také my jsme v naší práci prokázali, že průtokové rychlosti v ACM se s věkem snižují. Snížení rychlostí bylo přítomno jak u pacientů s FCh, tak u kontrolní skupiny. Pokud je nám známo, tato práce je první, která zkoumala věkově vázaný pokles průtokových rychlostí v ACM v kohortě pacientů s FCh. Konkrétně jsme zjistili, že pokles Vmb s věkem mezi pacienty s FCh není jen signifikantní, ale v porovnání s kontrolní skupinou je pokles rovněž rychlejší (téměř o 70 %). Vzhledem k tomu, že toto pozorování je první svého druhu je zapotřebí v této oblasti dalších výzkumů.

Cerebrovaskulární reaktivita

Schopnost mozkových tepen reagovat na vzestup pCO₂ vazodilatací a měření této odpovědi pomocí metody zadržetí dechu (Markus a Harrison, 1992) bývá využíván jako marker funkční integrity tepenné stěny. Hyperkapnie je jedním z nejsilnějších vazoaktivních podnětů vedoucím k arteriální vazodilataci (Kontos et al., 1977). Kromě vdechování vzduchu obohaceného CO₂ (Ringelstein et al., 1988; Vorstrup et al., 1992) se používá k dosažení hyperkapnie při hodnocení cerebrovaskulární reaktivity metoda zadržetí dechu, případně aplikace acetazolamidu (Markus a Harrison, 1992). Schopnost adekvátní vazoreaktivity je zejména spojena se správnou funkcí endotelu a hladkých svalových buněk cévní stěny.

Při analýze průměrných hodnot BHI (průměr ze všech 4 měření) bez korekcí jsme neprokázali signifikantní rozdíl mezi CVR u pacientů v porovnání s kontrolní skupinou. Toto zjištění je v souladu s výsledky jiných prací (čítající menší počty pacientů ve srovnání s naším souborem), které rovněž nezjistily významný rozdíl v CVR tepen přední mozkové cirkulace (Moore et al., 2002a; Segura et al., 2013; Castro et al., 2020). Signifikantní rozdíl jsme pozorovali po korekci na věk, pohlaví a BMI, kdy pacienti s FCh měli v porovnání s kontrolami nižší hodnotu BHI, přesto však stále v mezích normálních hodnot (Školoudík, 2003).

Za pozornost stojí, že při opakování testu BHI jsme u pacientů s FCh pozorovali nekonstantní odpovědi. Intraindividuální variabilita byla u pacientů s FCh ve srovnání s kontrolami významně vyšší. V kohortě pacientů se významným prediktorem zvýšení variability BHI jevila opět tíže nemoci vyjádřená skórem MSSI. Absence signifikantního vlivu ostatních zkoumaných prediktorů naznačuje, že variabilita BHI může být specifickým fenotypovým projevem FCh. Moore et al. (2002b) již dříve popsali regionálně prodlouženou odpověď (zvýšený průtok krve) na acetazolamid u pacientů s FCh. Je možné, že zvýšení pozorované variability BHI lze vysvětlit podobným patofyziologickým mechanismem jako abnormality pozorované Moorem et al. V literatuře byla popsána řada změn, které hypoteticky přispívají k variabilitě BHI, a to na úrovni intimy a tunica media nebo inervace tepen. Na úrovni intimy dominuje endoteliální dysfunkce, jejíž změny byly popsány na zvířecích modelech FCh (Shu et al., 2009; Meng et al., 2018), nebo snížená exprese K(Ca)_v3.1. kanálu v souvislosti s akumulací Gb3 (Park et al., 2011). Kromě Gb3 hraje roli i akumulace

jeho deacylované formy (globotriaosylsfinгоzinu – lysoGb3). Bylo prokázáno, že lysoGb3 stimuluje proliferaci hladkých svalových buněk in vitro (Barbey et al., 2006b; Aerts et al., 2008). Dále může mít na vaskulární dysfunkci vliv neuropatie tenkých nervových vláken, která je pro FCh typická, a která může narušovat správnou funkci vazomotorické inervace. Ačkoli se ukázalo, že aktivita sympatického nervového systému není pro cerebrovaskulární odpověď na hyperkapnii nutná, k odpovědi přispívá zvýšení středního tlaku (Przybylowski et al., 2003). Neuropatie tedy může hrát roli prostřednictvím zapojení do procesů regulace krevního tlaku.

Pulzatilní index

Goslingův neboli pulzatilní index je definovaný jako rozdíl nejvyšších systolických a nejnižších diastolických rychlostí vztažených k časově zprůměrované rychlosti proudění během jednoho srdečního cyklu (Gosling a King, 1974). Při sonografickém vyšetření se běžně používá automatický výpočet PI z automatické detekce obalové křivky kontinuálního průtokového spektra. (Tegeler et al., 2013) (Kešnerová et al., 2022). V tepnách zásobujících mozek nabývá hodnot do 1,0. Zvýšení PI bylo popsáno u různých vaskulárních rizikových faktorů, jako je arteriální hypertenze, DM, věk, mužské pohlaví (Kešnerová et al., 2022). Je známo, že zvýšení PI s věkem je různé u mužů a žen, u žen je rychlost nárůstu PI výraznější. (Alwatban et al., 2021).

Naše výsledky ukazují, že pacienti s FCh mají vyšší PI než kontrolní skupina. Vyšší PI jsme pozorovali u mužů, dále jsme pozorovali souvislost se zvyšujícím se věkem. Vliv věku a pohlaví jsme rovněž pozorovali v kohortě pacientů s FCh. Oba tyto nálezy jsou v souladu s pozorováními z většího českého souboru (Kešnerová et al., 2022). Kromě vlivu věku byly vyšší hodnoty pulzatility asociovány s nižší tepovou frekvencí jak u pacientů s FCh, tak u kontrol (dodatečná analýza). Tato souvislost není překvapivá, vztah TF a PI byl popsán (de Riva et al., 2012).

Nález vyššího PI u pacientů by mohl odrážet vaskulární postižení nemocných s FCh. Zvýšení PI bývá často interpretováno jako odraz rezistence distálního arteriálního řečiště a používá se jako marker mikroangiopatických změn v distálně od měřené tepny (Kidwell et al., 2001; Mok et al., 2012; Nam et al., 2020). Předpokládá se však, že také ztráta elasticity velkých cév ovlivňuje mikrocirkulaci v koncových orgánech. Důsledkem vyšší tuhosti elastických tepen je neschopnost takto změněných cév fungovat jako krevní rezervoár. Elastické tepny pak nedokážou chránit mikrocirkulaci

před následným přenosem škodlivých pulzací. Tento mechanismus může být významný zejména u orgánů, které mají vysoký průtok a nízkou vaskulární rezistenci, jako jsou například mozek nebo ledviny (Climie et al., 2019). V neposlední řadě také ke zvýšení PI u pacientů s FCh mohou přispívat i změny perivaskulární poddajnosti. K rozlišení, zda je zvýšený PI u pacientů s FCh způsoben mikroangiopatií nebo poškozením velkých elastických tepen, popřípadě postižením perivaskulární poddajnosti či kombinací všech uvedených faktorů, je zapotřebí dalších studií.

Abnormality bílé hmoty mozku

MRI mozku je základním nástrojem pro hodnocení strukturálních změn včetně vaskulárního poškození mozku v důsledku onemocnění malých tepen. V naší práci jsme hodnotili tíži postižení bílé hmoty u pacientů s FCh stanovením objemu lézí (hypointenzity na T1 vážených MPRAGE sekvencích) s využitím automatického softwaru. V několika předchozích pracích autoři objemově kvantifikovali výskyt lézí bílé hmoty u pacientů s FCh, vždy za použití FLAIR sekvencí (hyperintenzity v oblasti bílé hmoty) (Fellgiebel et al., 2009; Fellgiebel et al., 2012; Duning et al., 2013; Rost et al., 2016b). Z publikovaných dat vyplývá, že celková velikost lézí bílé hmoty se průměrně pohybovala, podobně jako v kohortě našich pacientů, od 1,1 ml do 4,9 ml. V nejpočetnější skupině pacient s FCh čítající 223 zkoumaných subjektů (Rost et al., 2016a) byl změřený objem WMAs ve srovnání s naší větší (muži 4,7 ml a ženy 4,9 ml v průměru). Na rozdíl od uvedené studie jsme k zobrazení mozku u našich pacientů s FCh použili citlivější 3T skener, na druhé straně byla volumetrická analýza prováděna na sekvencích MPRAGE. Vzhledem ke zřetelnějšímu zobrazení lézí na sekvencích FLAIR nebo T2W až donedávna upřednostňovala většina výzkumníků k hodnocení výskytu lézí měření s využitím těchto sekvencí. S pokrokem a vylepšeními zobrazovacích technik, včetně použití MPRAGE, se však zvýšila i citlivost na zobrazování v T1W. Kromě toho bylo prokázáno, že automatická kvantifikace objemu lézí na sekvencích T1W a FLAIR silně koreluje (Wei et al., 2019). Ačkoli objemy změn získaných z obrazů T1W tíži dystrofických změn pravděpodobně podhodnocují, mohou tyto hypointenzní léze mohou odrážet závažněji postižené tkáně než hyperintenzity ve FLAIR sekvencích, a mohou tedy být i klinicky relevantnější (Dadar et al., 2018). Bylo prokázáno, že vaskulární rizikové faktory korelují jak s objemy WMAs získanými z T1W, tak s objemy WMAs získanými z T2W a FLAIR obrazů (Dadar et al., 2018). Podobně u jiných onemocnění vedoucích k dystrofickým změnám v oblasti bílé hmoty mozku, není patofyziologie WMAs u nemocných s FCh plně objasněna. Kromě mikrovaskulárního

postižení mohou hrát roli i další faktory. Jako prediktory výraznějšího postižení bílé hmoty mozku jsme v našem souboru pomocí mnohorozměrné analýzy v první řadě závažnost onemocnění (vyšší skóre u MSSI). Dvě studie se zabývaly vztahem MSSI k WMAs. První práce, která používala manuální volumetrická měření WMAs, ukázala asociaci MSSI s WMAs. (Schermyly et al., 2011). Autoři druhé práce, jež však postižení bílé hmoty hodnotili kvalitativně, došli k závěru, že MSSI není významně odlišné při porovnání pacientů s FCh s WMAs a bez nich. (Reisin et al., 2011). Podobně jako ostatní autoři (Körver et al., 2018) jsme neidentifikovali pohlaví jako významný faktor ovlivňující tíži WMAs, i když jsme pozorovali trend výraznějšího postižení u mužů. V demografickém modelu jsme potvrdili vliv věku na objem WMAs. Vaskulární rizikové faktory, včetně hypertenze, jsou známými determinantami WMAs v běžné populaci (Zhuang et al., 2018 249). Na druhou stranu, stejně jako v naší práci, hypertenze nebyla shledána determinantou pro výskyt WMAs v dosud největší studované kohortě nemocných s FCh (Rost et al., 2016a). Je však nutné si uvědomit, že pacienti z naší kohorty jsou pravidelně sledováni a jejich vaskulární rizika jsou pečlivě intervenována. Adekvátní management vaskulárních rizikových faktorů v běžné populaci je spojen se snížením rizika výskytu cerebrovaskulárních komplikací. Lze se domnívat, že také pacienti s FCh budou z tohoto postupu profitovat. Nicméně cílové parametry jednotlivých intervenovaných rizik (glykémie, cholesterolémie, hodnoty krevního tlaku apod.) nejsou ve specifické populaci pacientů s FCh dosud definovány. Je otázkou, zdali by agresivnější terapie vaskulárních rizik u pacientů s FCh nevedla ke snížení rizika cerebrovaskulárních komplikací obecně. K odpovědi na tuto otázku je zapotřebí dalšího zkoumání.

5.3 Silné stránky a omezení

Mezi silné stránky naší práce patří relativně velké vzorky pacientů. V prevalenční studii bylo zahrnuto 986 nemocných s mrtvicí, což činí jeden z největších dosud publikovaných souborů zabývajících se prevalencí FCh v populaci pacientů s iktem. Také skupina pacientů s FCh, vzácnou genetickou poruchou, která byla zkoumána v rámci neurosonologické studie je velká. Dále, použití TCCS v analytické části umožnilo korekci úhlu insonace, což poskytuje přesnější měření rychlosti krevního toku.

Předkládaná práce má rovněž několik omezení, která mohla ovlivnit výsledky.

V prevalenční části je nutné zmínit:

Za první, ačkoli jsme se snažili zařadit do studie postupně všechny po sobě jdoucí pacienty, mohli jsme do ní zařadit jen ty, kteří byli schopni poskytnout souhlas s účastí v projektu. Nelze tak vyloučit zkreslení práce v důsledku vyššího zastoupení méně závažných případů.

Za druhé, v rámci testování jsme jako nejspolehlivější metodu pro screening u všech zařazených žen použili sekvenaci genu GLA. U mužů jsme však nejprve změřili aktivitu α -GAL A a biomarker lysoGb3. Do dalšího genetického testování byli zařazeni pouze pacienti s abnormálními hodnotami. Ačkoli tento postup byl použit v předchozích studiích (Wozniak et al., 2010; Romani et al., 2015; Kinoshita et al., 2018), může vést k podhodnocení celkové frekvence identifikovaných variant GLA, a to zejména u mužů. V případě benigních variant u mužů je pravděpodobné, že by jejich nositelé měli normální enzymovou aktivitu. V budoucích studiích by mělo být použito sekvenování GLA u všech subjektů.

V neurosonologické části je nutné zmínit:

Za první, vyšetřující nebyli zaslepeni, protože pacienti byli rekrutováni v rámci sledování Centra pro FCh, ačkoli náš vysoce standardizovaný interní protokol používaný pro vyšetřování orgánových projevů FCh minimalizuje zkreslení vlivem vyšetřujícího.

Za druhé, heterogenita v celkové délce léčby pacientů specifickou terapií, zahrnutí léčených i neléčených nemocných, může mít vliv na vaskulární fenotyp pacientů.

Za třetí, při měření cIMT nebyla konečná diastolická fáze stanovována pomocí EKG. Diastolu jsme identifikovali pomocí minimálního průměru tepny v průběhu srdečního cyklu a/nebo s využitím barevného dopplerovského zobrazení. Měření cIMT poloautomaticky, dvakrát na každé straně, a použití průměru ze všech čtyř měření pro další analýzu minimalizuje případnou chybu měření.

Za čtvrté, hodnocení variability BHI může být ovlivněno nesterjně dlouhými přestávkami mezi jednotlivými měřeními. Absence významných rozdílů ve Vmb v rámci jednotlivých měření u jednotlivých subjektů však naznačuje, že by to nemělo mít na výsledky vliv.

Za páté, zjištěné nevyvážené rozložení proměnných aktivní kouření, výskyt DM, hypertenze a dyslipidémie bránilo použití těchto proměnných jako kovariát ve statistických analýzách.

Za šesté, během testu zadržení dechu jsme neměřili krevní tlak kontinuálně. Změny krevního tlaku během zadržení dechu a jejich podíl na variabilitě reakce na zadržení dechu u FCh je třeba dále prostudovat.

6. Závěry, zhodnocení cílů a hypotéz

6.1 Práce č. 1. Stanovení prevalence Fabryho choroby u pacientů s iktem v České republice

Hypotéza č. 1: Mezi pacienty s akutní CMP se nacházejí dosud nediodagnostikovaní nemocní s Fabryho chorobou

Tato hypotéza byla potvrzena.

Studie prokázala, že prevalence FCh u neselektovaných dospělých pacientů s akutní cévní mozkovou příhodou v ČR je relativně vysoká. Oba pacienti, kteří měli s onemocněním spojenou variantu genu GLA, však byli v době cévní mozkové příhody mladší 50 let. Screeningová studie v populaci pacientů s CMP může být nástrojem k identifikaci nemocných s touto vzácnou nemocí. Naše výsledky však nepodporují screening FCh u starších pacientů s cévní mozkovou příhodou v běžné klinické praxi. Vzhledem k tomu, že Fabryho choroba je léčitelné onemocnění a diagnóza má důsledky pro další členy rodiny, neurologové by měli FCh zvažovat jako příčinu cévní mozkové příhody u pacientů z mladších věkových skupin.

6.2 Práce č. 2: Podrobné fenotypové charakteristiky GLA variant identifikovaných v rámci celostátního screeningu pacientů s cévní mozkovou příhodou v České republice

Hypotéza č. 2 Genetická analýza variant GLA genu u pacientů s cévním postižením s následky CMP povede k identifikaci pacientů se známými patogenními variantami spojenými s Fabryho chorobou, ale i k popisu nových variant.

Tato hypotéza byla potvrzena.

Naše druhá práce potvrdila nález patogenních variant ze screeningu Fabryho choroby u pacientů s CMP. Korelace genotyp-fenotyp vedla k návrhu překlasifikovat patogenní variantu G325S z varianty způsobující pozdní fenotyp FCh na variantu vedoucí ke klasickému typu. Nově identifikovanou variantu genu GLA R30K nebylo možné z hlediska patogenity zařadit. Dále naše práce naznačuje, že kombinace lakunární CMP u mladého člověka s nálezem zvýšeného počtu elementů (aseptické meningitidy) je vysoce sugestivní pro diagnózu FCh.

6.3 Práce č. 3: Cerebrovaskulární fenotyp u pacientů s Fabryho chorobou hodnocený pomocí ultrazvuku

Hypotéza č. 3: Mezi pacienty s FCh a zdravými kontrolami existují rozdíly v ve strukturálních a hemodynamických neurosonologických parametrech v oblasti extrakraniálních a intrakraniálních tepen.

Tato hypotéza byla potvrzena.

V práci jsme prokázali vícečetné rozdíly v neurosonologických parametrech mezi pacienty s FCh a skupinou subjektů bez FCh. Pozorované změny naznačují komplexní postižení cév v závislosti na věku u souboru nemocných s FCh.

Potvrdili jsme častější výskyt strukturálních změn cévní stěny velkých tepen (cIMT, dVA) u pacientů s FCh.

Zjistili jsme nižší cerebrovaskulární reaktivitu ACM u pacientů s FCh. Jako možný nový fenotyp specifický pro FCh jsme detekovali podstatně vyšší variabilitu reaktivity mozkových cév v odpovědi na test zadržení dechu. Prokázali jsme zvýšený PI u pacientů s FCh, který by mohl být odrazem zvýšené cévní rezistence a tuhosti cévního řečiště.

Došli jsme k závěru, že cerebrovaskulární postižení u FCh je komplexní, ale může být zhodnoceno pomocí, v klinické praxi běžně dostupného, neurosonologického vyšetření.

6.4 Práce č. 4: Prediktory cerebrovaskulárního postižení hodnoceného pomocí ultrazvuku a magnetické rezonance u pacientů s Fabryho chorobou

Hypotéza 4:

U pacientů s FCh lze mezi vybranými klinickými parametry nalézt prediktory vaskulárního postižení.

Tato hypotéza byla potvrzena.

V práci hodnotící vliv vybraných klinických parametrů na cerebrovaskulární postižení u pacientů s FCh jsme zjistili, že hlavními prediktory tohoto postižení jsou tíže Fabryho choroby a věk. Roli však hraje rovněž přítomnost klasických vaskulárních rizikových faktorů. U některých hemodynamických parametrů jsme identifikovali jako

další významné faktory vaskulárních abnormit rovněž vliv typu varianty GLA genu a tepové frekvence. Přestože Fabryho choroba je klinicky heterogenní onemocnění a jednotlivé orgánové systémy mohou být postiženy nerovnoměrně, naše práce ukázala, že míra komplexního cerebrovaskulárního postižení významně souvisí s celkovou tíží nemoci hodnocenou pomocí MSSI.

7. Souhrny

7.1 Souhrn a klinický význam

Tato disertační práce předkládá v rámci dvou tematických okruhů výsledky čtyř studií, které se zabývaly cerebrovaskulární problematikou u pacientů s Fabryho chorobou. První dvě práce ukazují význam vyhledávání pacientů v rizikové skupině nemocných s CMP a důležitost detailní fenotypizace nalezených genových variant. Druhé dvě práce, jejichž cílem bylo identifikovat abnormální vaskulární charakteristiky a jejich prediktory u nemocných s FCh, zkoumají pomocí zobrazovacích metod strukturální a hemodynamické aspekty cerebrovaskulárních projevů.

V prvním tematickém okruhu jsme se zaměřili na prevalenci FCh u pacientů s akutní CMP a následnou podrobnou analýzu všech osmi nalezených variant GLA genu. Celkem jsme nově diagnostikovali pět pacientů s Fabryho chorobou. Ukázali jsme, že prevalence variant genu GLA je v české populaci pacientů s akutní CMP relativně vysoká. Screeningové studie v „rizikových populacích“ však mohou generovat nálezy genových variant, které bez podrobné analýzy fenotypu mohou vést k nesprávné klasifikaci nalezené varianty. Diferenciální diagnostika mezi později nastupujícími projevy FCh, včetně cerebrovaskulárních, a podobnými chronickými nemocemi vyskytujícími se v běžné populaci, může být problematická. Nesprávné zařazení varianty má psychologický dopad na pacienty a jejich rodiny, vede k podávání zbytečné terapie či naopak diskvalifikuje pacienty z přístupu k účinné léčbě, ovlivňuje čerpání zdrojů na zdravotní péči, má vliv na výzkum. Proto jsme se zaměřili na podrobnou analýzu nalezených variant a na základě výsledků jsme navrhli překlasifikování varianty G325S z varianty late-onset na variantu s klasickým fenotypem. Nově identifikovanou variantu R30K nebylo zatím možné z hlediska patogenity přesně vyhodnotit a zařadit. Zásadní je však další prospektivní sledování všech nositelů VUS, a to včetně asymptomatických nosičů variant. Získané klinické údaje mohou v budoucnu pomoci objasnit fenotypové korelace alel (odlišit symptomy FCh od nespecifických komorbidit u nositelů benigních variant) a stanovit patogenitu VUS. Pacienti, u nichž jsme diagnostikovali přítomnost patologické varianty genu GLA, byli v době vzniku CMP mladší 50 let. Výsledky naší práce se odrazily v návrhu postupu stran diagnostiky FCh jako příčiny CMP (viz příloha č. 4), který schválil výbor Cerebrovaskulární sekce ČNS JEP.

V rámci druhého tematického okruhu jsme se zaměřili na neurosonologické a magneticko-rezonanční aspekty cerebrovaskulárního postižení. Výsledky naší průřezové studie případů a kontrol naznačují přítomnost komplexního strukturálního i hemodynamického cévního postižení u nemocných s FCh. Potvrdili jsme větší tloušťku intimo-medie v distální společné krkavici, širší průměr vertebrální tepny, vyšší index pulzatility a výraznější variabilitu vazoreaktivity při testu zadržetí dechu ve střední mozkové tepně. Do jaké míry se jednotlivé vaskulární abnormality podílejí na komplexní patofyziologii vzniku CMP, a jaká je případně jejich vzájemná interakce bude předmětem našeho dalšího výzkumu. V kohortové studii pacientů s FCh jsme se zaměřili na prediktory neurosonologických abnormalit a lézí bílé hmoty na MRI mozku. Jako hlavní prediktory vaskulárních změn jsme identifikovali věk a celkovou tíži nemoci hodnocenou pomocí MSSI. Určitý vliv, může mít rovněž přítomnost klasických vaskulárních rizikových faktorů. Adekvátní management vaskulárních rizikových faktorů v běžné populaci je spojen se snížením rizika výskytu cerebrovaskulárních komplikací. Lze se domnívat, že také pacienti s FCh budou rovněž z tohoto postupu profitovat. Nicméně cílové parametry jednotlivých intervenovaných rizik (glykémie, cholesterolémie, hodnoty krevního tlaku apod.) nejsou ve specifické populaci pacientů s FCh dosud definovány. Je otázkou, zdali by agresivnější terapie vaskulárních rizik u pacientů s FCh nevedla ke snížení výskytu cerebrovaskulárních abnormalit, potažmo komplikací obecně. K odpovědi na tuto otázku je zapotřebí dalšího zkoumání.

7.2 Summary and clinical implications

This thesis presents the results of four studies within two thematic areas, which dealt with cerebrovascular issues in patients with Fabry disease (FD). The first two papers show the importance of searching for FD patients in high-risk stroke group and the importance of detailed phenotyping of the patients with specific gene variants. The second two papers, aimed at identifying abnormal vascular characteristics and their predictors in patients with FD, investigate structural and hemodynamical aspects of cerebrovascular manifestations using imaging methods.

In the first thematic area, we focused on the prevalence of FD in patients with acute stroke, followed by a detailed analysis of all eight identified GLA gene variants. In total, we newly diagnosed five patients with Fabry disease. We showed that the prevalence of GLA gene variants is relatively high in the Czech population of patients with acute stroke. However, screening studies in "at-risk" populations may generate findings of gene variants that, without detailed phenotype analysis, may lead to misclassification of the variant found. Differential diagnosis between later-onset FD symptoms, including cerebrovascular, and similar chronic diseases occurring in the general population can be problematic. A misclassification of the variant has a psychological impact on patients and their families, leads to the administration of unnecessary therapy, or, conversely, disqualifies patients from accessing effective treatment. It also affects the use of resources for health care and has implications for research. Therefore, we focused on a detailed analysis of the variants found, and based on the results, we proposed reclassifying the G325S variant from a late-onset variant to a variant with a classic phenotype. The newly identified variant R30K still needs to be accurately evaluated and classified regarding pathogenicity. However, further prospective monitoring of all VUS carriers, including asymptomatic variant carriers, is essential. The clinical data obtained may help in the future to clarify phenotypic allele correlations (to distinguish FD symptoms from non-specific comorbidities in benign variant carriers) and to determine the pathogenicity of VUS. Patients in whom we diagnosed the presence of a pathological variant of the GLA gene were younger than 50 years at the time of stroke onset. The results of our work were reflected in a draft procedure for the FD diagnosis as a cause of stroke (see Appendix 4), which was approved by the Cerebrovascular Section Committee of the Czech Neurological Society JEP.

The second thematic area focused on neurosonological and magnetic resonance aspects of cerebrovascular disability. The results of our cross-sectional case-control study suggest the presence of complex structural and hemodynamic vascular impairment in patients with FD. We confirmed a greater intima-media thickness in the distal common carotid artery, a wider vertebral artery diameter, a higher pulsatility index, and a more pronounced variability of vasoreactivity in the middle cerebral artery during the breath-hold test. The extent to which the individual vascular abnormalities contribute to the complex pathophysiology of stroke and how they may interact will be the subject of our further research. In a cohort study of FD patients, we focused on predictors of neurosonological abnormalities and white matter lesions on brain MRI. We identified age and overall disease severity as assessed by MSSSI, as the main predictors of vascular changes. Classical vascular risk factors also have a particular influence. Adequate management of vascular risk factors in the general population is associated with a reduced risk of cerebrovascular complications. It can be assumed that patients with FD will also benefit from this approach. However, the target parameters of the individual risk interventions (such as glycaemia, cholesterolaemia, and blood pressure values) are not yet defined in the specific population of FD patients. It is questionable whether more aggressive treatment of vascular risks in FD patients would reduce the incidence of cerebrovascular abnormalities and, consequently, stroke in general. Further research is needed to answer this question.

8. Přehled literatury

1. ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD: Pohyb obyvatelstva - měsíční časové řady. Český statistický úřad [online], Praha, 2017 [cit.2017-10-10]. Dostupné z https://www.czso.cz/csu/czso/oby_cr_m.
2. FABRY-GEN-PHEN: The Fabry working Group Genotype Phenotype Database [online]. Amsterdam UMC [cit. 2020-11-24]. Dostupné z: <http://www.fabrygenphen.com>.
3. AASLID, R., T.-M. MARKWALDER AND H. NORNES Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. *Journal of Neurosurgery*, 01 Jan. 1982 1982, 57(6), 769.
4. AERTS, J. M., J. E. GROENER, S. KUIPER, W. E. DONKER-KOOPMAN, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Feb 26 2008, 105(8), 2812-2817.
5. AKGÜN, H., S. TAŞDEMİR, H. ULAŞ Ü, S. ALAY, et al. Reduced breath holding index in patients with chronic migraine. *Acta Neurol Belg*, Sep 2015, 115(3), 323-327.
6. ALWATBAN, M. R., S. E. AARON, C. S. KAUFMAN, J. N. BARNES, et al. Effects of age and sex on middle cerebral artery blood velocity and flow pulsatility index across the adult lifespan. *Journal of Applied Physiology*, 2021, 130(6), 1675-1683.
7. ANDERSON, W. A case of "Angeio-keratoma". *British Journal of Dermatology*, 1898, 10(4), 113-117.
8. ARENDS, M., M. BIEGSTRAATEN, D. A. HUGHES, A. MEHTA, et al. Retrospective study of long-term outcomes of enzyme replacement therapy in Fabry disease: Analysis of prognostic factors. *PLoS One*, 2017, 12(8), e0182379.
9. ASKARI, H., C. R. KANESKI, C. SEMINO-MORA, P. DESAI, et al. Cellular and tissue localization of globotriaosylceramide in Fabry disease. *Virchows Arch*, Oct 2007, 451(4), 823-834.
10. BANIKAZEMI, M., J. BULTAS, S. WALDEK, W. R. WILCOX, et al. Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease: a randomized trial. *Ann Intern Med*, Jan 16 2007, 146(2), 77-86.
11. BAR, M. Anatomie krčních a mozkových cév. In Š.O. ŠKOLOUDÍK DAVID, BAR MICHAL, BROZMAN MIROSLAV, VÁCLAVÍK DANIEL ed. *Neurosonologie*. Praha: Galén, 2003.
12. BARBEY, F., N. BRAKCH, A. LINHART, X. JEANRENAUD, et al. Increased carotid intima-media thickness in the absence of atherosclerotic plaques in an adult population with Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl*, Apr 2006a, 95(451), 63-68.
13. BARBEY, F., N. BRAKCH, A. LINHART, N. ROSENBLATT-VELIN, et al. Cardiac and vascular hypertrophy in Fabry disease: evidence for a new mechanism independent of blood pressure and glycosphingolipid deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Apr 2006b, 26(4), 839-844.
14. BATTISTI-CHARBONNEY, A., J. FISHER AND J. DUFFIN The cerebrovascular response to carbon dioxide in humans. *J Physiol*, Jun 15 2011, 589(Pt 12), 3039-3048.
15. BERTSCH, K., D. HAGEMANN, M. HERMES, C. WALTER, et al. Resting cerebral blood flow, attention, and aging. *Brain Res*, Apr 24 2009, 1267, 77-88.
16. BIEGSTRAATEN, M., R. ARNGRÍMSSON, F. BARBEY, L. BOKS, et al. Recommendations for initiation and cessation of enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: the European Fabry Working Group consensus document. *Orphanet J Rare Dis*, Mar 27 2015, 10, 36.
17. BOUTOUYRIE, P., S. LAURENT, B. LALOUEX, O. LIDOVE, et al. Arterial remodelling in Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl*, 2002, 91(439), 62-66.
18. BRADY, R. O., A. E. GAL, R. M. BRADLEY, E. MARTENSSON, et al. Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency. *N Engl J Med*, May 25 1967, 276(21), 1163-1167.
19. BROUNS, R., V. THIJS, F. EYSKENS, M. VAN DEN BROECK, et al. Belgian Fabry study: prevalence of Fabry disease in a cohort of 1000 young patients with cerebrovascular disease. *Stroke*, May 2010, 41(5), 863-868.

20. BURAND, A. J., JR. AND C. L. STUCKY Fabry disease pain: patient and preclinical parallels. *Pain*, May 1 2021, 162(5), 1305-1321.
21. CABRERA-SALAZAR, M. A., E. O'ROURKE, G. CHARRIA-ORTIZ AND J. A. BARRANGER Radiological evidence of early cerebral microvascular disease in young children with Fabry disease. *J Pediatr*, Jul 2005, 147(1), 102-105.
22. CAPUTO, F., L. LUNGARO, A. GALDI, E. ZOLI, et al. Gastrointestinal Involvement in Anderson-Fabry Disease: A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health*, Mar 23 2021, 18(6).
23. CASTRO, P., M. GUTIERRES, G. PEREIRA, S. FERREIRA, et al. Evaluation of Cerebral Microvascular Regulatory Mechanisms with Transcranial Doppler in Fabry Disease. *Brain Sci*, Aug 7 2020, 10(8).
24. CLAASSEN, J. A., A. S. MEEL-VAN DEN ABEELLEN, D. M. SIMPSON AND R. B. PANERAI Transfer function analysis of dynamic cerebral autoregulation: A white paper from the International Cerebral Autoregulation Research Network. *J Cereb Blood Flow Metab*, Apr 2016, 36(4), 665-680.
25. CLIMIE, R. E., A. GALLO, D. S. PICONE, N. DI LASCIO, et al. Measuring the Interaction Between the Macro- and Micro-Vasculature. *Front Cardiovasc Med*, 2019, 6, 169.
26. COCOZZA, S., G. OLIVO, E. RICCIO, C. RUSSO, et al. Corpus callosum involvement: a useful clue for differentiating Fabry Disease from Multiple Sclerosis. *Neuroradiology*, Jun 2017, 59(6), 563-570.
27. CRUTCHFIELD, K. E., N. J. PATRONAS, J. M. DAMBROSIA, K. P. FREI, et al. Quantitative analysis of cerebral vasculopathy in patients with Fabry disease. *Neurology*, Jun 1998, 50(6), 1746-1749.
28. DABERTRAND, F., M. T. NELSON AND J. E. BRAYDEN Acidosis Dilates Brain Parenchymal Arterioles by Conversion of Calcium Waves to Sparks to Activate BK Channels. *Circ Res*, 2012, 110(2), 285-294.
29. DADAR, M., J. MARANZANO, S. DUCHARME, O. T. CARMICHAEL, et al. Validation of T1w-based segmentations of white matter hyperintensity volumes in large-scale datasets of aging. *Hum Brain Mapp*, Mar 2018, 39(3), 1093-1107.
30. DAHL, A., K. F. LINDEGAARD, D. RUSSELL, R. NYBERG-HANSEN, et al. A comparison of transcranial Doppler and cerebral blood flow studies to assess cerebral vasoreactivity. *Stroke*, Jan 1992, 23(1), 15-19.
31. DE RIVA, N., K. P. BUDOHOSKI, P. SMIELEWSKI, M. KASPROWICZ, et al. Transcranial Doppler pulsatility index: what it is and what it isn't. *Neurocrit Care*, Aug 2012, 17(1), 58-66.
32. DESNICK, R. J. Fabry Disease: α -Galactosidase A deficiency. In *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease*. 2014, p. 419-430.
33. DESNICK, R. J. Chapter 38 - Fabry Disease: α -Galactosidase A Deficiency. In R.N. ROSENBERG AND J.M. PASCUAL. *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease (Fifth Edition)*. Boston: Academic Press, 2015, p. 419-430.
34. DIOMEDI, M., A. ROCCO, C. G. BONOMI, A. P. MASCOLO, et al. Haemodynamic impairment along the Alzheimer's disease continuum. *Eur J Neurol*, Jul 2021, 28(7), 2168-2173.
35. DOBROVOLNY, R., L. DVORAKOVA, J. LEDVINOVA, S. MAGAGE, et al. Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the alpha-galactosidase A gene in the Czech and Slovak population. *J Mol Med (Berl)*, Aug 2005, 83(8), 647-654.
36. DOHENY, D., R. SRINIVASAN, S. PAGANT, B. CHEN, et al. Fabry Disease: prevalence of affected males and heterozygotes with pathogenic GLA mutations identified by screening renal, cardiac and stroke clinics, 1995-2017. *J Med Genet*, Apr 2018, 55(4), 261-268.
37. DUBOST, J. J., I. L. VIALARD AND B. SAUVEZIE Chronic meningitis in Fabry's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, Jul 1985, 48(7), 714-715.

38. DUNING, T., M. DEPPE, E. BRAND, J. STYPMANN, et al. Brainstem involvement as a cause of central sleep apnea: pattern of microstructural cerebral damage in patients with cerebral microangiopathy. *PLoS One*, 2013, 8(4), e60304.
39. EARLEY, S., B. J. WALDRON AND J. E. BRAYDEN Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circ Res*, Oct 29 2004, 95(9), 922-929.
40. ENG, C. M., G. A. ASHLEY, T. S. BURGERT, A. L. ENRIQUEZ, et al. Fabry disease: thirty-five mutations in the alpha-galactosidase A gene in patients with classic and variant phenotypes. *Mol Med*, Mar 1997, 3(3), 174-182.
41. ENG, C. M., N. GUFFON, W. R. WILCOX, D. P. GERMAIN, et al. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med*, Jul 5 2001, 345(1), 9-16.
42. ENG, C. M., L. A. RESNICK-SILVERMAN, D. J. NIEHAUS, K. H. ASTRIN, et al. Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease. *Am J Hum Genet*, Dec 1993, 53(6), 1186-1197.
43. FABRY, J. Ein Beitrag zur Kenntniss der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). *Archiv für Dermatologie und Syphilis*, 1898/12/01 1898, 43(1), 187-200.
44. FAZEKAS, F., J. B. CHAWLUK, A. ALAVI, H. I. HURTIG, et al. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am J Roentgenol*, Aug 1987, 149(2), 351-356.
45. FELLGIEBEL, A., I. KELLER, D. MARIN, M. MÜLLER, et al. Diagnostic utility of different MRI and MR angiography measures in Fabry disease. *Neurology*, 2009, 72(1), 63-68.
46. FELLGIEBEL, A., I. KELLER, P. MARTUS, S. ROPELE, et al. Basilar artery diameter is a potential screening tool for Fabry disease in young stroke patients. *Cerebrovasc Dis*, 2011, 31(3), 294-299.
47. FELLGIEBEL, A., M. J. MÜLLER, M. MAZANEK, K. BARON, et al. White matter lesion severity in male and female patients with Fabry disease. *Neurology*, Aug 23 2005, 65(4), 600-602.
48. FELLGIEBEL, A., D. O. WOLF, E. KOLODNY AND M. J. MÜLLER Hippocampal atrophy as a surrogate of neuronal involvement in Fabry disease. *J Inherit Metab Dis*, 2012, 35(2), 363-367.
49. FERREIRA, S., A. ORTIZ, D. P. GERMAIN, M. VIANA-BAPTISTA, et al. The alpha-galactosidase A p.Arg118Cys variant does not cause a Fabry disease phenotype: data from individual patients and family studies. *Mol Genet Metab*, Feb 2015, 114(2), 248-258.
50. FIERMONTE, G., A. ANNULI AND F. PIERELLI Transcranial Doppler evaluation of cerebral hemodynamics in migraineurs during prophylactic treatment with flunarizine. *Cephalalgia*, Jun 1999, 19(5), 492-496.
51. FISCHL, B. FreeSurfer. *Neuroimage*, Aug 15 2012, 62(2), 774-781.
52. GARMAN, S. C. AND D. N. GARBOCZI The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Biol*, Mar 19 2004, 337(2), 319-335.
53. GERMAIN, D. P. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis*, Nov 22 2010, 5, 30.
54. GOSLING, R. G. AND D. H. KING Arterial assessment by Doppler-shift ultrasound. *Proc R Soc Med*, Jun 1974, 67(6 Pt 1), 447-449.
55. GRASSI, S., E. CHIRICOZZI, L. MAURI, S. SONNINO, et al. Sphingolipids and neuronal degeneration in lysosomal storage disorders. *J Neurochem*, Mar 2019, 148(5), 600-611.
56. GREISEN, G. Analysis of cerebroarterial Doppler flow velocity waveforms in newborn infants: towards an index of cerebrovascular resistance. *J Perinat Med*, 1986, 14(3), 181-187.
57. GUCE, A. I., N. E. CLARK, E. N. SALGADO, D. R. IVANEN, et al. Catalytic mechanism of human alpha-galactosidase. *J Biol Chem*, Feb 5 2010, 285(6), 3625-3632.
58. GUFFON, N., R. FROISSART, F. CHEVALIER-PORST AND I. MAIRE Mutation analysis in 11 French patients with Fabry disease. *Hum Mutat*, 1998, Suppl 1, S288-290.

59. GUO, C., D. FERREIRA, K. FINK, E. WESTMAN, et al. Repeatability and reproducibility of FreeSurfer, FSL-SIENAX and SPM brain volumetric measurements and the effect of lesion filling in multiple sclerosis. *Eur Radiol*, Mar 2019, 29(3), 1355-1364.
60. GUPTA, S., M. RIES, S. KOTSOPOULOS AND R. SCHIFFMANN The relationship of vascular glycolipid storage to clinical manifestations of Fabry disease: a cross-sectional study of a large cohort of clinically affected heterozygous women. *Medicine (Baltimore)*, Sep 2005, 84(5), 261-268.
61. HADJIVASSILIOU, M., R. A. GRÜNEWALD, R. H. KANDLER, A. K. CHATTOPADHYAY, et al. Neuropathy associated with gluten sensitivity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, Nov 2006, 77(11), 1262-1266.
62. HASHOLT, L., M. BALLEGAARD, H. BUNDGAARD, M. CHRISTIANSEN, et al. The D313Y variant in the GLA gene - no evidence of a pathogenic role in Fabry disease. *Scand J Clin Lab Invest*, Dec 2017, 77(8), 617-621.
63. HEINEN, R., M. D. STEENWIJK, F. BARKHOF, J. M. BIESBROEK, et al. Performance of five automated white matter hyperintensity segmentation methods in a multicenter dataset. *Sci Rep*, Nov 14 2019, 9(1), 16742.
64. HILZ, M. J., E. H. KOLODNY, M. BRYNS, B. STEMPEL, et al. Reduced cerebral blood flow velocity and impaired cerebral autoregulation in patients with Fabry disease. *J Neurol*, May 2004, 251(5), 564-570.
65. CHAMOLES, N. A., M. BLANCO AND D. GAGGIOLI Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta*, Jun 2001, 308(1-2), 195-196.
66. CHANDRA, A., W. A. LI, C. R. STONE, X. GENG, et al. The cerebral circulation and cerebrovascular disease I: Anatomy. *Brain Circ*, Apr-Jun 2017, 3(2), 45-56.
67. CHEW, E., M. GHOSH AND C. MCCULLOCH Amiodarone-induced cornea verticillata. *Can J Ophthalmol*, Jun 1982, 17(3), 96-99.
68. IDE, K., M. WORTHLEY, T. ANDERSON AND M. J. POULIN Effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NMMA on cerebrovascular and cardiovascular responses to hypoxia and hypercapnia in humans. *J Physiol*, Oct 1 2007, 584(Pt 1), 321-332.
69. JEŠINA, P. Diagnostika lysozomálních střádavých onemocnění. *Remedia*, 2019, 29(1), 82-90.
70. KALLIOKOSKI, R. J., K. K. KALLIOKOSKI, M. PENTTINEN, I. KANTOLA, et al. Structural and functional changes in peripheral vasculature of Fabry patients. *J Inherit Metab Dis*, Oct 2006, 29(5), 660-666.
71. KALVACH, P. *Mozkové ischemie a hemorhagie*. Edition ed. Praha: Grada Publishing, 2010. 456 p. ISBN 978-80-247-2765-3.
72. KASTRUP, A., G. KRÜGER, T. NEUMANN-HAEFELIN AND M. E. MOSELEY Assessment of cerebrovascular reactivity with functional magnetic resonance imaging: comparison of CO(2) and breath holding. *Magn Reson Imaging*, Jan 2001, 19(1), 13-20.
73. KEŠNEROVÁ, P., D. ŠKOLOUDÍK, R. HERZIG, D. NETUKA, et al. Peripheral Vascular Resistance in Cerebral Arteries in Patients With Carotid Atherosclerosis - Substudy Results of the Atherosclerotic Plaque Characteristics Associated With a Progression Rate of the Plaque and a Risk of Stroke in Patients With the Carotid Bifurcation Plaque Study (ANTIQUÉ). *J Ultrasound Med*, Jan 2022, 41(1), 237-246.
74. KIDWELL, C. S., S. EL-SADEN, Z. LIVSHITS, N. A. MARTIN, et al. Transcranial Doppler pulsatility indices as a measure of diffuse small-vessel disease. *J Neuroimaging*, Jul 2001, 11(3), 229-235.
75. KINOSHITA, N., N. HOSOMI, H. MATSUSHIMA, M. NAKAMORI, et al. Screening for Fabry Disease in Japanese Patients with Young-Onset Stroke by Measuring α -Galactosidase A and Globotriaosylsphingosine. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, Dec 2018, 27(12), 3563-3569.
76. KOKOTIS, P., N. ÜÇEYLER, C. WERNER, G. TSIVGOULIS, et al. Quantification of sweat gland innervation in patients with Fabry disease: A case-control study. *J Neurol Sci*, Jul 15 2018, 390, 135-138.

77. KONTOS, H. A., A. J. RAPER AND J. L. PATTERSON Analysis of vasoactivity of local pH, PCO₂ and bicarbonate on pial vessels. *Stroke*, 1977, 8(3), 358-360.
78. KORNREICH, R., R. J. DESNICK AND D. F. BISHOP Nucleotide sequence of the human alpha-galactosidase A gene. *Nucleic Acids Res*, Apr 25 1989, 17(8), 3301-3302.
79. KÖRVER, S., M. VERGOUWE, C. E. M. HOLLAK, I. N. VAN SCHAIK, et al. Development and clinical consequences of white matter lesions in Fabry disease: a systematic review. *Mol Genet Metab*, Nov 2018, 125(3), 205-216.
80. KOULOUSIOS, K., K. STYLIANOU, P. PATEINAKIS, M. ZAMANAKOU, et al. Fabry disease due to D313Y and novel GLA mutations. *BMJ Open*, Oct 6 2017, 7(10), e017098.
81. LANEY, D. A. AND P. M. FERNHOFF Diagnosis of Fabry disease via analysis of family history. *J Genet Couns*, Feb 2008, 17(1), 79-83.
82. LENDERS, M., F. WEIDEMANN, C. KURSCHAT, S. CANAAN-KÜHL, et al. Alpha-Galactosidase A p.A143T, a non-Fabry disease-causing variant. *Orphanet J Rare Dis*, May 4 2016, 11(1), 54.
83. LEVEY, A. S., L. A. STEVENS, C. H. SCHMID, Y. L. ZHANG, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*, May 5 2009, 150(9), 604-612.
84. LIDOVE, O., M. P. CHAUVEHEID, C. CAILLAUD, R. FROISSART, et al. Aseptic meningitis and ischaemic stroke in Fabry disease. *Int J Clin Pract*, Nov 2009, 63(11), 1663-1667.
85. LIDOVE, O., U. RAMASWAMI, R. JAUSSAUD, F. BARBEY, et al. Hyperhidrosis: a new and often early symptom in Fabry disease. International experience and data from the Fabry Outcome Survey. *Int J Clin Pract*, Sep 2006, 60(9), 1053-1059.
86. LIN, H. Y., K. W. CHONG, J. H. HSU, H. C. YU, et al. High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population. *Circ Cardiovasc Genet*, Oct 2009, 2(5), 450-456.
87. LINTHORST, G. E., M. G. BOUWMAN, F. A. WIJBURG, J. M. AERTS, et al. Screening for Fabry disease in high-risk populations: a systematic review. *J Med Genet*, Apr 2010, 47(4), 217-222.
88. LUKAS, J., C. CIMMARUTA, L. LIGUORI, S. PANTOOM, et al. Assessment of Gene Variant Amenability for Pharmacological Chaperone Therapy with 1-Deoxygalactonojirimycin in Fabry Disease. *Int J Mol Sci*, Jan 31 2020, 21(3).
89. LUKAS, J., A. K. GIESE, A. MARKOFF, U. GRITNER, et al. Functional characterisation of alpha-galactosidase a mutations as a basis for a new classification system in fabry disease. *PLoS Genet*, 2013, 9(8), e1003632.
90. MANARA, R., R. Y. CARLIER, S. RIGHETTO, V. CITTON, et al. Basilar Artery Changes in Fabry Disease. *AJNR Am J Neuroradiol*, Mar 2017, 38(3), 531-536.
91. MARKUS, H. S. AND M. J. HARRISON Estimation of cerebrovascular reactivity using transcranial Doppler, including the use of breath-holding as the vasodilatory stimulus. *Stroke*, May 1992, 23(5), 668-673.
92. MARQUARDT, L., R. BAKER, H. SEGAL, A. I. BURGESS, et al. Fabry disease in unselected patients with TIA or stroke: population-based study. *Eur J Neurol*, Nov 2012, 19(11), 1427-1432.
93. MAYES, J. S., J. B. SCHEERER, R. N. SIFERS AND M. L. DONALDSON Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clin Chim Acta*, May 5 1981, 112(2), 247-251.
94. MCCAFFERTY, E. H. AND L. J. SCOTT Migalastat: A Review in Fabry Disease. *Drugs*, Apr 2019, 79(5), 543-554.
95. MEIKLE, P. J., J. J. HOPWOOD, A. E. CLAGUE AND W. F. CAREY Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama*, Jan 20 1999, 281(3), 249-254.
96. MENG, X. L., E. ARNING, M. WIGHT-CARTER, T. S. DAY, et al. Priapism in a Fabry disease mouse model is associated with upregulated penile nNOS and eNOS expression. *J Inherit Metab Dis*, Mar 2018, 41(2), 231-238.

97. MERTA, M., J. REITEROVA, J. LEDVINOVA, H. POUPETOVA, et al. A nationwide blood spot screening study for Fabry disease in the Czech Republic haemodialysis patient population. *Nephrol Dial Transplant*, Jan 2007, 22(1), 179-186.
98. MOK, V., D. DING, J. FU, Y. XIONG, et al. Transcranial Doppler ultrasound for screening cerebral small vessel disease: a community study. *Stroke*, Oct 2012, 43(10), 2791-2793.
99. MOORE, D. F., G. ALTARESCU, P. HERSCOVITCH AND R. SCHIFFMANN Enzyme replacement reverses abnormal cerebrovascular responses in Fabry disease. *BMC Neurol*, Jun 18 2002a, 2, 4.
100. MOORE, D. F., G. ALTARESCU, G. S. LING, N. JEFFRIES, et al. Elevated cerebral blood flow velocities in Fabry disease with reversal after enzyme replacement. *Stroke*, Feb 2002b, 33(2), 525-531.
101. MUEHLBACHER, M., P. TRIPAL, F. ROAS AND J. KORNHUBER Identification of drugs inducing phospholipidosis by novel in vitro data. *ChemMedChem*, Nov 2012, 7(11), 1925-1934.
102. MÜLLER, M., M. VOGES, U. PIEPGRAS AND K. SCHIMRIGK Assessment of cerebral vasomotor reactivity by transcranial Doppler ultrasound and breath-holding. A comparison with acetazolamide as vasodilatory stimulus. *Stroke*, Jan 1995, 26(1), 96-100.
103. NAGAMATSU, K., Y. SEKIJIMA, K. NAKAMURA, K. NAKAMURA, et al. Prevalence of Fabry disease and GLA c.196G>C variant in Japanese stroke patients. *J Hum Genet*, Jul 2017, 62(7), 665-670.
104. NAKAMURA, K., Y. SEKIJIMA, K. NAKAMURA, K. HATTORI, et al. p.E66Q mutation in the GLA gene is associated with a high risk of cerebral small-vessel occlusion in elderly Japanese males. *Eur J Neurol*, 2014, 21(1), 49-56.
105. NAM, K. W., H. M. KWON AND Y. S. LEE Distinct association between cerebral arterial pulsatility and subtypes of cerebral small vessel disease. *PLoS One*, 2020, 15(7), e0236049.
106. NANCE, C. S., C. J. KLEIN, M. BANIKAZEMI, S. H. DIKMAN, et al. Later-onset Fabry disease: an adult variant presenting with the cramp-fasciculation syndrome. *Arch Neurol*, Mar 2006, 63(3), 453-457.
107. NGAI, A. C. AND H. R. WINN Modulation of cerebral arteriolar diameter by intraluminal flow and pressure. *Circ Res*, Oct 1995, 77(4), 832-840.
108. NIEMANN, M., A. ROLFS, A. GIESE, H. MASCHER, et al. Lyso-Gb3 Indicates that the Alpha-Galactosidase A Mutation D313Y is not Clinically Relevant for Fabry Disease. *JIMD Rep*, 2013, 7, 99-102.
109. ODER, D., N. ÜÇEYLER, D. LIU, K. HU, et al. Organ manifestations and long-term outcome of Fabry disease in patients with the GLA haplotype D313Y. *BMJ Open*, Apr 8 2016, 6(4), e010422.
110. OHSHIMA, T., G. J. MURRAY, J. W. NAGLE, J. M. QUIRK, et al. Structural organization and expression of the mouse gene encoding alpha-galactosidase A. *Gene*, Dec 12 1995, 166(2), 277-280.
111. ORTIZ, A., A. ABIOSE, D. G. BICHET, G. CABRERA, et al. Time to treatment benefit for adult patients with Fabry disease receiving agalsidase β : data from the Fabry Registry. *J Med Genet*, Jul 2016, 53(7), 495-502.
112. ORTIZ, A., D. P. GERMAIN, R. J. DESNICK, J. POLITEI, et al. Fabry disease revisited: Management and treatment recommendations for adult patients. *Mol Genet Metab*, Apr 2018, 123(4), 416-427.
113. PALECEK, T., J. HONZIKOVA, H. POUPETOVA, H. VLASKOVA, et al. Prevalence of Fabry disease in male patients with unexplained left ventricular hypertrophy in primary cardiology practice: prospective Fabry cardiomyopathy screening study (FACSS). *J Inherit Metab Dis*, May 2014, 37(3), 455-460.
114. PARK, S., J. A. KIM, K. Y. JOO, S. CHOI, et al. Globotriaosylceramide leads to K(Ca)_v3.1 channel dysfunction: a new insight into endothelial dysfunction in Fabry disease. *Cardiovasc Res*, Feb 1 2011, 89(2), 290-299.

115. PEISKER, T., A. BARTOŠ, O. SKODA, I. IBRAHIM, et al. Impact of aging on cerebral vasoregulation and parenchymal integrity. *J Neurol Sci*, Dec 15 2010, 299(1-2), 112-115.
116. PHAN L, J. Y., ZHANG H, QIANG W, SHEKHTMAN E, SHAO D., REVOE D., VILAMARIN R., IVANCHENKO E, KIMURA M, WANG Z. Y., HAO L., SHAROPOVA N., BIHAN M., STURCKE A., LEE M., POPOVA N., WU W., BASTIANI C., WARD M., HOLMES J.B., LYOSHIN V., KAUR K., MOYER E., FEOLO M., KATTMAM B. L. ALFA: allele frequency aggregator. In.: National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine, 2020.
117. PHILLIPS, A. A., F. H. CHAN, M. M. ZHENG, A. V. KRASSIOUKOV, et al. Neurovascular coupling in humans: Physiology, methodological advances and clinical implications. *J Cereb Blood Flow Metab*, Apr 2016, 36(4), 647-664.
118. POLITEI, J. M., D. BOUHASSIRA, D. P. GERMAIN, C. GOIZET, et al. Pain in Fabry Disease: Practical Recommendations for Diagnosis and Treatment. *CNS Neurosci Ther*, Jul 2016, 22(7), 568-576.
119. POMPEN, A. W. M., M. RUITER AND H. J. G. WYERS Angiokeratoma corporis diffusum (universale) Fabry, as a sign of an unknown internal disease; two autopsy reports. *Acta Medica Scandinavica*, 1947, 128(3), 234-255.
120. POORTHUIS, B. J. H. M., R. A. WEVERS, W. J. KLEIJER, J. E. M. GROENER, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Human Genetics*, 1999/08/01 1999, 105(1), 151-156.
121. PRZYBYŁOWSKI, T., M.-F. BANGASH, K. REICHMUTH, B. J. MORGAN, et al. Mechanisms of the cerebrovascular response to apnoea in humans. *J Physiol*, 2003, 548(1), 323-332.
122. RAIZMAN, M. B., P. HAMRAH, E. J. HOLLAND, T. KIM, et al. Drug-induced corneal epithelial changes. *Surv Ophthalmol*, May-Jun 2017, 62(3), 286-301.
123. REISIN, R. C., C. ROMERO, C. MARCHESONI, G. NÁPOLI, et al. Brain MRI findings in patients with Fabry disease. *J Neurol Sci*, Jun 15 2011, 305(1-2), 41-44.
124. REKOVÁ, P., G. DOSTÁLOVÁ, D. KEMLINK, J. PAULASOVÁ SCHWABOVÁ, et al. Detailed Phenotype of GLA Variants Identified by the Nationwide Neurological Screening of Stroke Patients in the Czech Republic. *J Clin Med*, Aug 12 2021, 10(16).
125. REKOVÁ, P., SEDLÁKOVÁ, K., DOSTÁLOVÁ, G., LINHART, A. Fabryho choroba, přehled problematiky a nejčastější neurologické projevy. *Cesk Slov Neurol N*, 2018, 2, 156-163.
126. RINGELSTEIN, E. B., C. SIEVERS, S. ECKER, P. A. SCHNEIDER, et al. Noninvasive assessment of CO₂-induced cerebral vasomotor response in normal individuals and patients with internal carotid artery occlusions. *Stroke*, 1988, 19(8), 963-969.
127. RINGELSTEIN, E. B., S. VAN EYCK AND I. MERTENS Evaluation of cerebral vasomotor reactivity by various vasodilating stimuli: comparison of CO₂ to acetazolamide. *J Cereb Blood Flow Metab*, Jan 1992, 12(1), 162-168.
128. ROLFS, A., T. BÖTTCHER, M. ZSCHIESCHE, P. MORRIS, et al. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet*, Nov 19 2005, 366(9499), 1794-1796.
129. ROLFS, A., F. FAZEKAS, U. GRITTMER, M. DICHGANS, et al. Acute cerebrovascular disease in the young: the Stroke in Young Fabry Patients study. *Stroke*, Feb 2013, 44(2), 340-349.
130. ROMANI, I., W. BORSINI, P. NENCINI, A. MORRONE, et al. De novo Diagnosis of Fabry Disease among Italian Adults with Acute Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, Nov 2015, 24(11), 2588-2595.
131. ROMBACH, S. M., B. VAN DEN BOGAARD, E. DE GROOT, J. E. GROENER, et al. Vascular aspects of Fabry disease in relation to clinical manifestations and elevations in plasma globotriaosylsphingosine. *Hypertension*, Oct 2012, 60(4), 998-1005.
132. ROST, N. S., L. CLOONAN, A. S. KANAKIS, K. M. FITZPATRICK, et al. Determinants of white matter hyperintensity burden in patients with Fabry disease. *Neurology*, 2016a, 86(20), 1880-1886.

133. ROST, N. S., L. CLOONAN, A. S. KANAKIS, K. M. FITZPATRICK, et al. Determinants of white matter hyperintensity burden in patients with Fabry disease. *Neurology*, May 17 2016b, 86(20), 1880-1886.
134. RUITER, M., POMPEN, W. M. Angiokeratoma corporis diffusum (universale) mit kardiovasorenalem Symptomenkomplex bei 3 Briidern. . *Archiv für Dermatologie und Syphilis*, 1939, 179, 165.
135. SAVER, J. L., N. CHAISINANUNKUL, B. C. V. CAMPBELL, J. C. GROTTA, et al. Standardized Nomenclature for Modified Rankin Scale Global Disability Outcomes: Consensus Recommendations From Stroke Therapy Academic Industry Roundtable XI. *Stroke*, Aug 2021, 52(9), 3054-3062.
136. SEGURA, T., O. AYO-MARTÍN, I. GÓMEZ-FERNANDEZ, C. ANDRÉS, et al. Cerebral hemodynamics and endothelial function in patients with Fabry disease. *BMC Neurol*, Nov 11 2013, 13, 170.
137. SHIM, Y., B. YOON, D. S. SHIM, W. KIM, et al. Cognitive correlates of cerebral vasoreactivity on transcranial Doppler in older adults. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, Jun 2015, 24(6), 1262-1269.
138. SHU, L., J. L. PARK, J. BYUN, S. PENNATHUR, et al. Decreased nitric oxide bioavailability in a mouse model of Fabry disease. *J Am Soc Nephrol*, Sep 2009, 20(9), 1975-1985.
139. SCHERMULY, I., M. J. MÜLLER, K. M. MÜLLER, J. ALBRECHT, et al. Neuropsychiatric symptoms and brain structural alterations in Fabry disease. *Eur J Neurol*, Feb 2011, 18(2), 347-353.
140. SCHIFFMANN, R., J. B. KOPP, H. A. AUSTIN, 3RD, S. SABNIS, et al. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *Jama*, Jun 6 2001, 285(21), 2743-2749.
141. SCHREIBER, W., A. UDVARDI AND W. KRISTOFERITSCH Chronic meningitis and lacunar stroke in Fabry disease. *J Neurol*, Oct 2007, 254(10), 1447-1449.
142. SCHULTE-MECKLENBECK, A., I. KLEFFNER, C. BEUKER, T. WIRTH, et al. Immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in ischaemic stroke. *Eur J Neurol*, Jun 2019, 26(6), 919-926.
143. SILVESTRINI, M., L. M. CUPINI, E. TROISI, M. MATTEIS, et al. Estimation of cerebrovascular reactivity in migraine without aura. *Stroke*, Jan 1995, 26(1), 81-83.
144. SIMS, K., J. POLITEI, M. BANIKAZEMI AND P. LEE Stroke in Fabry disease frequently occurs before diagnosis and in the absence of other clinical events: natural history data from the Fabry Registry. *Stroke*, Mar 2009, 40(3), 788-794.
145. SMID, B. E., C. E. HOLLAK, B. J. POORTHUIS, M. A. VAN DEN BERGH WEERMAN, et al. Diagnostic dilemmas in Fabry disease: a case series study on GLA mutations of unknown clinical significance. *Clin Genet*, Aug 2015, 88(2), 161-166.
146. SPADA, M., S. PAGLIARDINI, M. YASUDA, T. TUKEL, et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet*, Jul 2006, 79(1), 31-40.
147. SWEeley, C. C. AND B. KLIONSKY Fabry's disease: Classification as a Sphingolipidosis and Partial Characterization of a Novel Glycolipid. *J Biol Chem*, Sep 1963, 238, 3148-3150.
148. ŠKODA, O. B., M; ŠKOLOUDÍK, D Duplexní sonografie extrakraniálních tepen – národní standard vyšetřovací metodiky. *Cesk Slov Neurol N*, 2002, 1, 5-8.
149. ŠKODA, O. H., R; MIKULÍK, R; NEUMANN, J; VÁCLAVÍK, D; BAR, M; ŠAŇÁK, D; TOMEK, A; ŠKOLOUDÍK, D; CEREBROVASKULÁRNÍ SEKCE ČESKÉ NEUROLOGICKÉ SPOLEČNOSTI ČLS JEP Klinický standard pro diagnostiku a léčbu pacientů s ischemickou cévní mozkovou příhodou a s tranzitorní ischemickou atakou – verze 2016. *Cesk Slov Neurol N*, 2016, 79(112(3)), 351-363.
150. ŠKOLOUDÍK, D., ŠKODA, O., BAR, M., BROZMAN, M., VÁCLAVÍK, D. *Neurosonologie*. Edition ed. Praha: Galén, 2003. xv, 303: il. + pracovní příloha (323 s.: il) p. ISBN 80-7262-245-5.
151. TALBOT, A. AND K. NICHOLLS Elevated Lyso-Gb3 Suggests the R118C GLA Mutation Is a Pathological Fabry Variant. *JIMD Rep*, 2019, 45, 95-98.

152. TEGELER, C. H., K. CRUTCHFIELD, M. KATSNELSON, J. KIM, et al. Transcranial Doppler Velocities in a Large, Healthy Population. *Journal of Neuroimaging*, 2013, 23(3), 466-472.
153. TERRY, W., R. VANHOLDER, D. HEMELSOET, B. P. LEROY, et al. Questioning the Pathogenic Role of the GLA p.Ala143Thr "Mutation" in Fabry Disease: Implications for Screening Studies and ERT. *JIMD Rep*, 2013, 8, 101-108.
154. THURBERG, B. L., H. RANDOLPH BYERS, S. R. GRANTER, R. G. PHELPS, et al. Monitoring the 3-year efficacy of enzyme replacement therapy in fabry disease by repeated skin biopsies. *J Invest Dermatol*, Apr 2004, 122(4), 900-908.
155. TOMEK, A., P. REKOVÁ, J. PAULASOVÁ SCHWABOVÁ, A. OLŠEROVÁ, et al. Nationwide screening for Fabry disease in unselected stroke patients. *PLoS One*, 2021, 16(12), e0260601.
156. TOMEK, A., B. URBANOVÁ AND J. HORT Utility of transcranial ultrasound in predicting Alzheimer's disease risk. *J Alzheimers Dis*, 2014, 42 Suppl 4, S365-374.
157. TOUBOUL, P. J., M. G. HENNERICI, S. MEAIRS, H. ADAMS, et al. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis*, 2012, 34(4), 290-296.
158. UÇEYLER, N., L. HE, A. K. KAHN, F. BREUNIG, et al. Cerebral blood flow in patients with Fabry disease as measured by Doppler sonography is not different from that in healthy individuals and is unaffected by treatment. *J Ultrasound Med*, Mar 2012, 31(3), 463-468.
159. UÇEYLER, N., G. A. HOMOLA, H. GUERRERO GONZÁLEZ, D. KRAMER, et al. Increased arterial diameters in the posterior cerebral circulation in men with Fabry disease. *PLoS One*, 2014, 9(1), e87054.
160. URBANOVA, B., A. TOMEK, R. MIKULIK, H. MAGEROVA, et al. Neurosonological Examination: A Non-Invasive Approach for the Detection of Cerebrovascular Impairment in AD. *Front Behav Neurosci*, 2014, 8, 4.
161. UYAMA, E., N. UENO, M. UCHINO, T. NARAHARA, et al. Headache associated with aseptic meningeal reaction as clinical onset of Fabry's disease. *Headache*, Sep 1995, 35(8), 498-501.
162. VAN BREEMEN, M. J., S. M. ROMBACH, N. DEKKER, B. J. POORTHUIS, et al. Reduction of elevated plasma globotriaosylsphingosine in patients with classic Fabry disease following enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta*, Jan 2011, 1812(1), 70-76.
163. VAN DEN MUNCKHOF, I. C. L., H. JONES, M. T. E. HOPMAN, J. DE GRAAF, et al. Relation between age and carotid artery intima-medial thickness: a systematic review. *Clin Cardiol*, May 2018, 41(5), 698-704.
164. VAN DER TOL, L., D. CASSIMAN, G. HOUGE, M. C. JANSSEN, et al. Uncertain diagnosis of fabry disease in patients with neuropathic pain, angiokeratoma or cornea verticillata: consensus on the approach to diagnosis and follow-up. *JIMD Rep*, 2014, 17, 83-90.
165. VAN DER VEEN, S. J., C. E. M. HOLLAK, A. B. P. VAN KUILENBURG AND M. LANGEVELD Developments in the treatment of Fabry disease. *J Inherit Metab Dis*, Sep 2020, 43(5), 908-921.
166. VEDDER, A. C., G. E. LINTHORST, M. J. VAN BREEMEN, J. E. GROENER, et al. The Dutch Fabry cohort: diversity of clinical manifestations and Gb3 levels. *J Inherit Metab Dis*, Feb 2007, 30(1), 68-78.
167. VINALL, P. E. AND F. A. SIMEONE Cerebral autoregulation: an in vitro study. *Stroke*, Sep-Oct 1981, 12(5), 640-642.
168. VORSTRUP, S., V. ZBORNIKOVA, H. SJÖHOLM, L. SKOGLUND, et al. CBF and transcranial Doppler sonography during vasodilatory stress tests in patients with common carotid artery occlusion. *Neurological Research*, 1992/03/01 1992, 14(1), 31-38.
169. VUJKOVAC, A. C., B. VUJKOVAC, S. NOVAKOVIĆ, M. ŠTEVANEC, et al. Characteristics of Vascular Phenotype in Fabry Patients. *Angiology*, May 2021, 72(5), 426-433.

170. WEI, K., T. TRAN, K. CHU, M. T. BORZAGE, et al. White matter hypointensities and hyperintensities have equivalent correlations with age and CSF β -amyloid in the nondemented elderly. *Brain Behav*, Dec 2019, 9(12), e01457.
171. WHYBRA, C., C. KAMPMANN, F. KRUMMENAUER, M. RIES, et al. The Mainz Severity Score Index: a new instrument for quantifying the Anderson-Fabry disease phenotype, and the response of patients to enzyme replacement therapy. *Clin Genet*, Apr 2004, 65(4), 299-307.
172. WILLIE, C. K., Y. C. TZENG, J. A. FISHER AND P. N. AINSLIE Integrative regulation of human brain blood flow. *J Physiol*, Mar 1 2014, 592(5), 841-859.
173. WOZNIAK, M. A., S. J. KITTNER, S. TUHRIM, J. W. COLE, et al. Frequency of unrecognized Fabry disease among young European-American and African-American men with first ischemic stroke. *Stroke*, Jan 2010, 41(1), 78-81.
174. YASUDA, M., J. SHABBEER, S. D. BENSON, I. MAIRE, et al. Fabry disease: characterization of alpha-galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele. *Hum Mutat*, Dec 2003, 22(6), 486-492.
175. ZHUANG, F. J., Y. CHEN, W. B. HE AND Z. Y. CAI Prevalence of white matter hyperintensities increases with age. *Neural Regen Res*, Dec 2018, 13(12), 2141-2146.
176. ZOTTER, A., F. BÄUERLE, D. DEY, V. KISS, et al. Quantifying enzyme activity in living cells. *J Biol Chem*, Sep 22 2017, 292(38), 15838-15848.
177. ŽIVNÁ, M., G. DOSTÁLOVÁ, V. BAREŠOVÁ, D. MUŠÁLKOVÁ, et al. AGAL misprocessing-induced ER stress and the unfolded protein response: lysosomal storage-independent mechanism of Fabry disease pathogenesis? *bioRxiv*, 2022, 2022.2009.2027.509714.

9. Seznam publikací

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertační práce

a) s impakt faktorem

TOMEK, A*, **P. REKOVÁ***, J. PAULASOVÁ SCHWABOVÁ, A. OLŠEROVÁ, et al. Nationwide screening for Fabry Disease in unselected stroke patients. Plos One, 2021, 16(12), e0260601. **IF** = 3,752

(*sdílené prvoautorství)

REKOVÁ, P., G. DOSTÁLOVÁ, D. KEMLINK, J. PAULASOVÁ SCHWABOVÁ, et al. Detailed Phenotype of GLA Variants Identified by the Nationwide Neurological Screening of Stroke Patients in the Czech Republic. J Clin Med, Aug 12, 2021, 10(16). **IF** = 4,964

REKOVA, P., G. DOSTÁLOVÁ, D. ROB, M. VANECKOVA et al. Cerebrovascular Phenotype in Fabry Disease Patients Assessed by Ultrasound. J Ultrasound. Med, May 20, 2023. J Ultrasound Med. 2023 May 20. doi: 10.1002/jum.16254. Epub ahead of print. **IF** = 2,754

REKOVÁ, P., K. SEDLÁKOVÁ, G. DOSTÁLOVÁ, A. LINHART. Fabryho choroba, přehled problematiky a nejčastější neurologické projevy. Cesk Slov Neurol N, 2018, 2, 156-163. **IF** = 0,377

b) bez impakt faktoru

DOSTÁLOVÁ, G., **P. REKOVÁ**, K. SEDLÁKOVÁ, O. KODET, et al. Fabryho choroba, Interní Med. 2018; 20(1): 10-13

DOSTÁLOVÁ, G., **P. REKOVÁ**, K. SEDLÁKOVÁ, O. KODET et al. Fabryho choroba (Fabry disease). Dermatologie pro praxi 2018; 12(2): 80-82.

DOSTÁLOVÁ, G., L. ROBLOVÁ, **P. REKOVÁ**, J. MAREK, et al. Anderson-Fabry disease and gastrointestinal tract involvement. Gastroent Hepatol 2020; 74(2): 158-162. Doi:1014735/amgh2020158.

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertační práce

a) s impakt faktorem

NEUMANN, J., ŠAŇÁK, D., TOMEK, A., BAR, M., HERZIG, R., KOVÁŘ, M., MIKULÍK, R., **REKOVÁ, P.** et al. Doporučení pro intravenózní trombolýzu v léčbě mozkového infarktu – verze 2021. Cesk Slov Neurol N 2021, 84/117(3):291-299.

IF = 0,411

SVIN COVID-19 Global SAH Registry*. Global impact of the COVID-19 pandemic on subarachnoid haemorrhage hospitalisations, aneurysm treatment and in-hospital mortality: 1-year follow-up. J Neurol Neurosurg Psychiatry, JUL 28, 2022, 93:1028-1038. **IF** = 13,654

(*spoluautor **REKOVA, P**)

SVIN COVID-19 Global Stroke Registry*. Global Impact of the COVID-19 Pandemic on Stroke Volumes and Cerebrovascular Events: A 1-Year Follow-up. *Neurology.*, JAN 24, 2023;100(4):e408-e421. IF = 12,258
(*spoluator **REKOVA, P**)

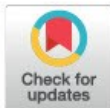
10. Přílohy

10.1 Příloha 1

RESEARCH ARTICLE

Nationwide screening for Fabry disease in unselected stroke patients

Aleš Tomek¹*, Reková Petra^{2,6}, Jaroslava Paulasová Schwabová¹, An na Olšerová¹, Miroslav Škorňa³, Miroslava Nevšímalová⁴, Libor Šimůnek⁵, Roman Herzig⁵, Štěpánka Fafejtová⁶, Petr Mikulěnka⁷, Alena Táboříková⁸, Jiří Neumann⁸, Richard Brzezny⁹, Helena Sobolová¹⁰, Jan Bartoník¹¹, Daniel Václavík¹², Marta Vachová¹³, Karel Bechyně¹⁴, Hana Havlíková¹⁵, Tomáš Prax¹⁶, Daniel Šaňák¹⁷, Irena Černíková¹⁸, Iva Onděčková¹⁹, Petr Procházka²⁰, Jan Rajner²¹, Miroslav Škoda²², Jan Novák²³, Ondřej Škoda²⁴, Michal Bar²⁵, Robert Mikulík²⁶, Gabriela Dostálová²⁷, Aleš Linhart²⁷, on behalf of the National Stroke Research Network, part of Czech Clinical Research Infrastructure Network (CZECRIN) and Czech Neurological Society, Cerebrovascular Section[†]



1 Second Faculty of Medicine, Department of Neurology, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, **2** First Faculty of Medicine, Department of Neurology and Center of Clinical Neuroscience, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic, **3** Department of Neurology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic, **4** Department of Neurology, Hospital České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic, **5** Faculty of Medicine in Hradec Králové and University Hospital Hradec Králové, Department of Neurology, Hradec Králové, Czech Republic, **6** Department of Neurology, Regional Hospital Karlovy Vary, Karlovy Vary, Czech Republic, **7** 3rd Medical Faculty, Department of Neurology Neurology Dpt., Charles University and University Hospital Kralovské Vinohrady, Prague, Czech Republic, **8** Department of Neurology Neurology Dpt., Krajská zdravotní, a.s.—Hospital Chomutov, Chomutov, Czech Republic, **9** Department of Neurology Neurology Dpt., Regional Hospital Kladno, Kladno, Czech Republic, **10** Department of Neurology Neurology Dpt., Hospital Třinec, Třinec, Czech Republic, **11** Department of Neurology Neurology Dpt., Regional Hospital of Tomáš Baťa, Zlín, Czech Republic, **12** Department of Neurology, AGEL Research and Training Institute, Ostrava Vítkovice Hospital, Ostrava, Czech Republic, **13** Department of Neurology, Krajská zdravotní, a.s.—Hospital Teplice, Teplice, Czech Republic, **14** Department of Neurology, Hospital Písek, Písek, Czech Republic, **15** Department of Neurology, Regional Hospital Liberec, Liberec, Czech Republic, **16** Department of Neurology, Regional Hospital Pardubice, Pardubice, Czech Republic, **17** Department of Neurology, Palacký University Medical School and Hospital, Olomouc, Czech Republic, **18** Department of Neurology, Regional Hospital Kolín, Kolín, Czech Republic, **19** Department of Neurology, Krajská zdravotní, a.s.—Hospital Děčín, Děčín, Czech Republic, **20** Department of Neurology, Regional Hospital Uherské Hradiště, Uherské Hradiště, Czech Republic, **21** Department of Neurology, Municipal Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic, **22** Department of Neurology, Regional Hospital Náchod, Náchod, Czech Republic, **23** Department of Neurology, Regional Hospital Česká Lípa, Česká Lípa, Czech Republic, **24** Department of Neurology, Hospital Jihlava, Jihlava, Czech Republic, **25** Department of Neurology, University Hospital Ostrava and Faculty of Medicine, Ostrava University, Ostrava, Czech Republic, **26** International Clinical Research Center and Department of Neurology, St. Anne's University Hospital and Medical Faculty of Masaryk University, Brno, Czech Republic, **27** First Faculty of Medicine, 2nd Department of Medicine—Department of Cardiovascular Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

* These authors contributed equally to this work.

† Membership of the National Stroke Research Network is provided in the Acknowledgments.

* ales.tomek@gmail.com

OPEN ACCESS

Citation: Tomek A, Petra R, Paulasová Schwabová J, Olšerová A, Škorňa M, Nevšímalová M, et al. (2021) Nationwide screening for Fabry disease in unselected stroke patients. PLoS ONE 16(12): e0260601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260601>

Editor: Tomohiko Ai, Ohio State University, UNITED STATES

Received: March 26, 2021

Accepted: November 12, 2021

Published: December 14, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260601>

Copyright: © 2021 Tomek et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are available within the paper.

Funding: This received support from Takeda (formerly Shire), which awarded a grant to the

Abstract

Background and aims

Fabry disease (FD) is a rare X-linked lysosomal storage disorder caused by disease-associated variants in the *alpha-galactosidase A* gene (*GLA*). FD is a known cause of stroke in

Czech Medical Society of J.E. Purkyně with primary investigator AT. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section. The funders of grant had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. No additional external funding was received for this study.

Competing interests: The authors have read the journal's policy and have the following competing interests: Takeda (formerly Shire) awarded a grant to the Czech Medical Society of J.E. Purkyně with primary investigator AT. AT, JPS, PR, GD, AL have received speaker's fees from Takeda. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials. There are no patents, products in development or marketed products associated with this research to declare.

younger patients. There are limited data on prevalence of FD and stroke risk in unselected stroke patients.

Methods

A prospective nationwide study including 35 (78%) of all 45 stroke centers and all consecutive stroke patients admitted during three months. Clinical data were collected in the RES-Q database. FD was diagnosed using dried blood spots in a stepwise manner: in males—enzymatic activity, globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) quantification, if positive followed by *GLA* gene sequencing; and in females *GLA* sequencing followed by lyso-Gb3.

Results

986 consecutive patients (54% men, mean age 70 years) were included. Observed stroke type was ischemic 79%, transient ischemic attack (TIA) 14%, intracerebral hemorrhage (ICH) 7%, subarachnoid hemorrhage 1% and cerebral venous thrombosis 0.1%. Two (0.2%, 95% CI 0.02–0.7) patients had a pathogenic variant associated with the classical FD phenotype (c.1235_1236delCT and p.G325S). Another fourteen (1.4%, 95% CI 0.08–2.4) patients had a variant of *GLA* gene considered benign (9 with p.D313Y, one p.A143T, one p.R118C, one p.V199A, one p.R30K and one p.R38G). The index stroke in two carriers of disease-associated variant was ischemic lacunar. In 14 carriers of *GLA* gene variants 11 strokes were ischemic, two TIA, and one ICH. Patients with positive as compared to negative *GLA* gene screening were younger (mean 60±SD, min, max, vs 70±SD, min, max, $P = 0.02$), otherwise there were no differences in other baseline variables.

Conclusions

The prevalence of FD in unselected adult patients with acute stroke is 0.2%. Both patients who had a pathogenic *GLA* gene variant were younger than 50 years. Our results support FD screening in patients that had a stroke event before 50 years of age.

Introduction

Fabry disease (FD) is a progressive, X-linked inherited disorder of glycosphingolipid metabolism due to deficient or absent α -galactosidase-A (α -Gal-A) activity caused by over 1000 known disease-associated variants in the *GLA* gene [1]. The α -Gal-A deficiency results in the accumulation of globotriaosylceramide (Gb3) and other glycosphingolipids in various cell types, including capillary endothelial cells, renal, cardiac, and nerve cells [2].

FD is a disease with a broad spectrum of heterogeneously progressive clinical phenotypes due to the different residual levels of α -Gal-A activity. The most severe part of the spectrum is the classical phenotype in hemizygous males with onset in childhood or adolescence and symptoms including acroparesthesias, angiokeratomas, hypohidrosis, gastrointestinal symptoms, corneal dystrophy (cornea verticillata), cardiac, renal and cerebrovascular manifestations. On the other end of the spectrum are milder late-onset phenotypes observed in males with some degree of residual α -Gal-A activity and most symptomatic heterozygous females, with dominance of one organ system impairment, e.g., renal, cardiac, or nervous system including cerebrovascular disease [2].

The most devastating neurologic consequence of FD is stroke, which occurs at an increased prevalence and a younger age in the FD patients compared with the general population [3]. The prevalence of stroke in FD patients observed in the Fabry Outcome Survey was 11.1% in males and 15.7% in females [4]. Interestingly 50% of males and 38.3% of females experienced their first stroke before being diagnosed with Fabry disease [5]. The most frequent type of stroke in FD patients is ischemic (86.8%), but 16.9% of males and 6.9% of females had hemorrhagic strokes [5]. The small-vessel disease is the most commonly seen etiological subtype of ischemic stroke in young patients with FD, manifesting as either lacunar stroke or as asymptomatic cerebral white matter hyperintensity on magnetic resonance imaging. Nearly half of FD patients had small vessel disease on magnetic resonance imaging in one study [6]. The second most common ischemic stroke subtype in FD patients is cardioembolic stroke due to the higher incidence of left ventricular hypertrophy with diastolic function impairment, atrial fibrillation, prothrombotic state, and hypertension secondary to chronic renal failure [2,7,8]. Notably, late-onset patients are often misdiagnosed and unrecognized throughout life due to the atypical adult-onset and frequently silent family history. Therefore, many FD screening studies in the last twenty years concentrated on high-risk groups of patients—cardiac patients with cardiomyopathy, renal impairment patients on hemodialysis, and mostly younger cryptogenic ischemic stroke patients [9]. However, the data on the prevalence of *GLA* variants in stroke patients are sometimes conflicting since the pathogenicity of some of them had not been definitely established or are currently reclassified as benign [9,10]. A recent meta-analysis of screening studies in stroke patients (5978 patients in total) found that 0.13% males and 0.14% females had a pathogenic *GLA* variant, and 0.54% males, and 0.96% females had a likely benign *GLA* variant [9]. Furthermore, the majority of screening studies have been done in younger patients with cryptogenic ischemic stroke and might not represent the true burden of FD pathology in unselected cerebrovascular disease populations.

Aim and rationale

Considering the limited information available on the prevalence of FD in cerebrovascular disease outside the most studied group of young patients with cryptogenic ischemic stroke, we conducted the present study to investigate the prevalence of FD in unselected stroke patients irrespective of the stroke subtype, etiology, sex or age.

Methods

Study design and patient selection

We performed a prospective nationwide multicenter study, including consecutive stroke patients admitted during respective predefined three months in stroke centers in the Czech Republic. All consenting patients presenting with an acute cerebrovascular disease admitted during March 2018, October 2018, and March 2019 were included in the study irrespective of the exact stroke subtype. We included patients presenting during the study duration with a transient ischemic attack, ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, subarachnoid hemorrhage, and cerebral venous thrombosis, regardless of stroke etiology or patient age. There were no other exclusion or inclusion criteria. All patients gave written informed consent with the study, including the genetic analyses. The study has a substudy with wider inclusion criteria that is still recruiting patients with cryptogenic ischemic stroke irrespective of age and date of the index stroke. The results of the of the substudy are not reported in this article.

Data collection

Clinical data were collected in the Registry of Stroke Care Quality (RES-Q), an internet-based registry database used for continuous monitoring of the quality of stroke care by all certified stroke centers in the Czech Republic and the countries participating in European Stroke Organisation Enhancing and Accelerating Stroke Treatment (ESO—EAST) program [11]. Although RES-Q is primarily designed for monitoring the quality and especially the logistics of acute stroke care, we added a specific database entry on the inclusion in the study during the study periods. We collected demographic characteristics (age, gender), type of cerebrovascular event, stroke risk factors (hypertension, atrial fibrillation, carotid stenosis, previous stroke), initial stroke severity (NIHSS stroke scale), and clinical outcome at discharge (mRS scale). The full list of clinical parameters included in the RES-Q database was published in detail previously [11]. There was no predefined set of required clinical investigations. All patients were examined according to their treating physician adhering to the national standard of care [12].

Diagnosis of Fabry disease

FD was diagnosed using dried blood spots in a stepwise manner combining genetic and enzyme testing. After obtaining the informed consent, peripheral blood was drawn and transferred to commercially available filtration paper (CentoCard, CentoGene AG). Samples were allowed to dry at room temperature, stored at a plastic sleeve in room temperature for no more than one week until sent for analysis. All samples of patients were analyzed in the designated study laboratory CentoGene AG (Rostock, Germany). The algorithm for FD screening was dependent on gender. In males, the enzymatic activity of alpha-galactosidase-A (α -Gal-A) and the concentration of the biomarker globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) were determined using fluorimetry and liquid chromatography-mass spectrometry, respectively [13]. If the activity of α -Gal-A was decreased $< 15.3 \mu\text{mol/L/h}$ and/or the concentration of lysoGb3 was increased $> 1.8 \text{ ng/ml}$, then the *GLA* gene was sequenced. The *GLA* gene was analyzed by an amplicon-based next-generation sequencing approach. The amplicons covered the entire coding region and the highly conserved exon-intron splice junctions (used reference sequence of the *GLA* gene was NM_000169.2). The libraries were sequenced on an Illumina platform (MiSeq). An in-house bioinformatics pipeline including read alignment to GRCh37/hg19 genome assembly, variant calling and annotation is used. We have a minimum coverage of $>20x$ for every amplicon. Missing regions or regions of poor quality are completed with classical Sanger sequencing to achieve 100% coverage. Given the expected high rate of false-negative results of enzymatic assays in females, *GLA* gene sequencing was the first method used. If a variant genotype was found, then the measurement of lyso-Gb3 was done. The result of FD screening was sent to the referring physician. Patients with positive screening results were referred from a stroke center to specialized Fabry Disease center in General Faculty Hospital, Prague, for further clinical and laboratory investigations and management, including family screening.

Statistical analysis

Demographic and clinical data were summarized with descriptive statistics. Demographic parameters in patients with and without FD diagnosis were compared using Mann-Whitney U test for continuous variables and χ^2 test or Fisher's exact test for non-continuous variables and p value was corrected for multiple comparisons. For comparison of genotype frequencies, we used Fisher's exact included in EPITAB function of STATA. P values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 25 (IBM, USA) and STATA IC 16.1 (StataCorp, USA).

Funding and study organization

The protocol was designed by the Executive Committee of the Cerebrovascular Section of the Czech Neurological Society and approved by the Executive Committee of the Czech Neurological Society. The Motol University Hospital ethics board approved the study protocol; subsequently, the protocol was approved by institutional boards in all participating sites. The Executive Committee of the Cerebrovascular section served as the Steering committee of the study. The required laboratory tests for FD were financed through a grant from Takeda (formerly Shire) to the Czech Neurological Society. The data collection and all other patient examinations excluding the specific FD tests were not reimbursed specifically outside the general health insurance. The sponsor of the study had no role in study design, data collection, analysis, or interpretation of the results.

Results

We enrolled 986 consecutive acute cerebrovascular disease patients in 35 stroke centers. The detailed demographic and clinical parameters are given in Table 1. The mean age at stroke onset was 70.0 years (SD 12.8; range 24–97 years). Ischemic stroke was diagnosed in 79.6%, transient ischemic attack in 13.4%, intracerebral hemorrhage in 6.4%, subarachnoid hemorrhage in 0.5%, and cerebral venous thrombosis in 0.1% of our cohort. Sixteen (1.6%) patients

Table 1. Demographic and clinical parameters of screened acute cerebrovascular disease patients.

	Entire cohort	Positive screening result—disease-associated variant / variant in <i>GLA</i> gene present	Negative screening result—disease-associated variant / variant in <i>GLA</i> gene not present	P-value between groups*
Subjects, No. (%)	986	16 (1.6)	970 (98.4)	
Men, No. (%)	536 (54.4)	6 (37.5)	530 (54.6)	0.172
Age, mean (SD), range, years	70.0 (12.8), 24–97	60.1 (16.8), 34–83	70.2 (12.7), 24–97	0.021
Ischemic stroke, No. (%)	782 (79.3)	13 (81.3)	769 (79.3)	0.845
Transient ischemic attack, No. (%)	134 (13.6)	2 (12.5)	132 (13.6)	0.897
Intracerebral hemorrhage, No. (%)	64 (6.5)	1 (6.3)	63 (6.5)	0.968
Subarachnoidal hemorrhage, No. (%)	5 (0.5)	0	5 (0.5)	0.685
Cerebral venous thrombosis, No. (%)	1 (0.1)	0	1 (0.1)	0.856
Atrial fibrillation, No. (%)	211 (21.4)	2 (12.5)	209 (21.5)	0.545
Hypertension, No. (%)	771 (78.2)	10 (62.5)	761 (78.5)	0.132
Smoking, No. (%)	256 (26.0)	5 (31.3)	251 (25.9)	0.634
Symptomatic internal carotid artery stenosis > 50%	122 (12.4)	3 (18.8)	119 (12.3)	0.435
Recurrent stroke, No. (%)	199 (20.2)	2 (12.5)	197 (20.3)	0.489
Onset NIHSS, mean (SD), range, points	4.2 (5.2), 0–32	5.6 (4.5), 2–15	4.2 (5.1), 0–32	0.057
Duration of initial hospitalization, mean (SD), days	8.3 (8.8)	6.1 (3.1)	8.3 (8.9)	0.687
Good clinical outcome (discharge mRS 0–2)	644 (67.2)	14 (87.5)	630 (66.9)	0.107

NIHSS—National Institute of Health Stroke Scale, mRS—modified Rankin Scale.

*) Using the χ^2 test, Fisher's exact test or Mann-Whitney U test as appropriate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260601.t001>

Table 2. Basic characteristics of patients with disease-associated variant or variant genotype in *GLA* gene.

Patient, age [years]	GLA gene-nucleotide change	α -Gal-A-amino acid change	Lyso-Gb3 [ng/mL]	α -Gal-A activity [μ mol/L/h]	Onset NIHSS	Stroke risk factors	Stroke type, etiology, territory	Pretstroke mRS	Discharge mRS
Fabry disease associated <i>GLA</i> variants									
Male, 34	c.973G>A	p.G325S	19.8	<2.8	2	Smoking	Ischemic, SVD, VB	0	1
Female, 40	c.1235_1236delCT	x	n.a.	6.22	3	Smoking	Ischemic, SVD, VB	0	0
<i>GLA</i> variant genotype with unclear significance or neutral to FD									
Female, 83	c.89G>A	p.R30K	1.0	n.a.	2	Hypertension, dementia	Ischemic, SVD, VB	1	1
Female, 78	c.112A>G	p.R38G	1.0	n.a.	8	Atrial fibrillation, hypertension, PVD, previous ischemic stroke	Ischemic, cardioembolic, MCA occlusion	1	1
Female, 70	c.427G>A	p.A143T	1.1	n.a.	4	Hypercholesterolemia, hypertension, PVD	TIA, MCA	0	0
Female, 47	c.352C>T	p.R118C	0.8	n.a.	3	Hypertension	TIA, MCA	0	0
Male, 78	c.596>C	p.V199A	1.3	9.4	12	Atrial fibrillation, IHD, smoking, COPD	Ischemic, cardioembolic, BA occlusion	0	1
Male, 41	c.937G>T	p.D313Y	1.6	11.1	15	Hypertension	Intracerebral hemorrhage in basal ganglia	1	4
Female, 72	c.937G>T	p.D313Y	0.9	n.a.	3	Hypertension, IHD	Ischemic, LVD, ICA	1	1
Male, 54	c.937G>T	p.D313Y	1.0	12.1	5	Smoking, hypercholesterolemia	Ischemic, LVD, ICA	0	2
Male, 64	c.937G>T	p.D313Y	1.1	13.4	6	Hypercholesterolemia, hypertension, IHD	Ischemic, SVD, VB	0	4
Female, 44	c.937G>T	p.D313Y	1.0	n.a.	15	None	Ischemic, cryptogenic embolic, MCA	0	1
Female, 71	c.937G>T	p.D313Y	1.2	n.a.	4	Hypercholesterolemia, hypertension	Ischemic, SVD, MCA	0	1
Female, 44	c.937G>T	p.D313Y	1.1	n.a.	2	Previous ischemic stroke and TIA	Ischemic, SVD, MCA	0	1
Female, 83	c.937G>T	p.D313Y	1.4	n.a.	2	DM, hypercholesterolemia, hypertension, IHD, PVD, pulmonary embolism	Ischemic, cryptogenic embolic, MCA	2	2
Male, 59	c.937G>T	p.D313Y	1.1	14.8	3	Hypertension, smoking	Ischemic, SVD, MCA	0	0

α -Gal-A = Alpha-galactosidase-A; lyso-Gb3 = globotriaosylsphingosine; n.a. = not available (α -Gal-A activity was not assessed in screening of females); PVD = peripheral vascular disease; IHD = ischemic heart disease; DM = Diabetes mellitus; COPD = Chronic obstructive pulmonary disease; mRS = modified Rankin Scale; TIA = Transient ischemic attack; SVD = small vessel disease; LVD = large vessel disease; VB = vertebra-basilar territory; MCA = middle cerebral artery; ICA = Internal carotid artery; BA = basilar artery.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260601.t002>

in total—13 with ischemic stroke, 2 with TIA, and one intracerebral hemorrhage—had a positive result of the screening. Compared to the patients with negative screening, they were younger (mean 60.0, vs. 70.1, $P = 0.02$, range 34–83 years). There was a trend for fewer males (37.5% vs. 54.6%) and a higher admission NIHSS (5.6 vs. 4.2). Otherwise, there were not any significant differences observed in collected parameters. The clinical details on positively screened patients are given in Table 2.

Two (0.2%) patients had a variant associated with the classical FD phenotype

Both patients and their families were undiagnosed with FD before the index stroke.

The first was male aged 34 years with lacunar thalamic infarction who had a disease associated *GLA* variant c.973G>A (G325S), decreased activity of α -Gal-A (<2.8 μ mol/L/h) and increased LysoGb3 (19.8 ng/mL). After subsequent detailed screening for FD symptoms, incipient renal impairment and ocular pathology (marked tortuosity of the retinal vessels) were discovered, and patient was initiated on enzyme replacement therapy.

The second patient with pathogenic variant (heterozygous deletion c.1235_1236delCT) and normal α -Gal-A activity was female, aged 40 years, presenting with lacunar mesencephalic infarction. Five years before the index stroke, corneal opacities were noted in an ophthalmology exam, but the FD diagnosis was not followed through. Apart from ocular involvement, mild proteinuria and stroke, no other pathology was observed in the detailed screening of FD symptoms. The patient was also initiated on enzyme replacement therapy.

Fourteen (1.4%) patients had genetic variants in the *GLA* gene that are mostly considered to be benign (FD neutral), or their clinical significance is not clear

The most prevalent variant genotype in nine patients was c.937G>T (D313Y). One of the carriers of p.D313Y was male, aged 41 years, with typical intracerebral hemorrhage in basal ganglia, all other patients had an ischemic stroke, details are given in Table 2. We found five different non-pathogenic variants in our cohort, each in one respective patient—female, aged 70 years c.427G>A (A143T); female, aged 47 years c.352C>T (R118C); male, old 78 years c.596>C (V199A); female, aged 83 years c.89G>A (R30K); and female, aged 78 years c.112A>G (R38G). If we exclude two patients with clearly disease associated variants, then the mean age of 14 patients with variant genotype was 63.4 (SD 15.2, range 41–83), statistically not different from patients with negative screening ($P = 0.11$).

The frequency of disease-associated variants and variant of unclear clinical significance in *GLA* gene in the study population stratified by sex and age is shown in detail in Table 3. Variant genotype was the most frequent in females aged under 50 years (9.1%). On the other hand, the frequency of benign variant *GLA* genotype in the study population over 50 years was 1.4% in females and 0.8% in males. Irrespective of sex, we have found that in patients under 50 years of age, 2.5% of patients had a known disease-associated variant and that 5.1% of patients had a benign *GLA* variant genotype. We did not find any pathogenic disease-associated variant of the *GLA* gene in patients above the age of 50 years. We compared frequencies of benign *GLA* variants observed in our stroke cohort with available population data. We did not see any significant differences compared to the published frequencies of benign *GLA* variants in the general population of European descent. Details are given in Table 4.

Table 3. Frequency of variant *GLA* genotype in study population stratified by sex and age.

	Entire cohort	Females	Females 0–49 years	Females 50 + years	Males	Males 0–49 years	Males 50 + years
Subjects, No. (% of the entire cohort)	986 (100)	450 (45.6)	33 (3.3)	417 (42.4)	536 (54.4)	46 (4.7)	490 (49.6)
Fabry disease associated variant carriers	2 (0.2)	1 (0.2)	1 (3.0)	0	1 (0.2)	1 (2.2)	0
Variant considered benign (FD neutral or with unclear significance)	14 (1.4)	9 (2.0)	3 (9.1)	6 (1.4)	5 (0.9)	1 (2.2)	4 (0.8)

Number of subjects, percentages in parentheses are given according to the columns, except for the first row.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260601.t003>

Table 4. *GLA* variants considered benign or with unclear clinical significance discovered in our study and their population frequency.

Variant	dbSNP identifier	Patients with variant in our screened cohort (n = 986), No.	Allelic frequency of variant in screened cohort	General population allelic frequency	Sample size for population frequency, No.	P-value between groups using Fisher's exact test for comparison of proportions
c.89G>A (p. R30K)	Not included in dbSNP	1	0.001	0.0000839 [†]	n.a. [‡]	0.085
c.112A>G (p. R38G)	rs730880446	1	0.001	0.0001399 [†]	n.a. ^{‡*}	0.128
c.352C>T (p. R118C)	rs148158093	1	0.001	0.00052 [†]	79354 [*]	0.406
c.427G>A (p. A143T)	rs104894845	1	0.001	0.00101 [†]	81358 [*]	1.00
c.596T>C (p. V199A)	rs781871113	1	0.001	0.0002 [†]	6062 [*]	0.186
c.937G>T (p. D313Y)	rs28935490	9	0.0091	0.00554 [†]	81344 [*]	0.130

Frequency data according to *) ALFA: Allele Frequency Aggregator. National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine, European data (Phan et al., 2020)

†) CentoLSD database (<https://www.centogene.com/centolsd.html>) as available.

dbSNP = The Single Nucleotide Polymorphism Database of Nucleotide Sequence Variation (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260601.t004>

Discussion

Our prospective countrywide screening study in unselected stroke patients found that 0.2% of patients had a disease-associated *GLA* variant with the classical FD phenotype. These numbers are comparable to the prevalence of 0.13% in males and 0.14% in females reported by a recent meta-analysis [9]. Similarly, we did not observe a different prevalence of likely benign *GLA* variants—in our study—0.9% in males and 1.4% in females compared to the meta-analysis—0.54% in males and 0.96% in females [9].

The strength of our study compared to most of the previous studies is the inclusion of all consecutive stroke patients, irrespective of stroke subtype, stroke etiology, sex, and especially age. Our study included 907 patients above the age of 50 years. Actually, 25% of our cohort was older than 79 years. To our knowledge, only three studies up to date included stroke patients irrespective of their age. Two of them were done in Japan—Nakamura et al screened only males with mean age 69.7±12.5 years, and Nagamatsu et al tested both genders with mean age 74.1±12.5 years [14,15]. Marquardt et al. did the only study in stroke patients older than 60 years of age in the population of European descent with the mean age being 73.2 years, 85% patients in the cohort were older than 60 years [16]. That is fully comparable to our cohort, where 801 (81.2%) patients were older than 60 years. Compared to Marquardt et al. [16] we also included 64 patients with spontaneous intracerebral hemorrhage with mean age 69.3±13.7 years.

Clinically important finding is that FD with a disease-associated *GLA* variation is probably very rare or nonexistent in elderly stroke patients. Both our patients with a disease-associated variant were younger than 50 years. In fact, in this most frequently screened age subgroup, 2.5% of our cohort had a disease-associated *GLA* gene variant compared to none in patients above the age of 50 years. Therefore, based on our results we would not recommend screening patients suffering from stroke above 50 years of age.

The important finding of our study is the relatively high observed number of carriers of *GLA* variant p.D313Y because such finding may suggest connection between such variant and risk of stroke. Although our observed frequencies did not differ significantly from the largest

available populational data, we have seen a trend for a higher occurrence of p.D313Y in our cohort. We found 9 (0.9%) patients compared to 0.5% reported amongst populations of European descent [17]. The mean age of these nine patients, four males, and five females, was 59.1 years. None of them had elevated Lyso-Gb3. In four male carriers, where α -Gal-A activity was measured, none of them showed enzyme activity <35%. All of the nine patients did not have any apparent clinical signs of other organ involvement besides stroke; for further details, see Table 2.

The data regarding the pathogenicity and clinical relevance of the p.D313Y variant are despite more than two decades of research still controversial. Currently is the variant p.D313Y most often referred to as benign (International Fabry Disease Genotype-Phenotype Database, dbFGP, www.dbfgp.org) or polymorphism with unknown significance (<http://fabry-database.org/>). The carriers of the p.D313Y variant do not manifest the classical early-onset FD phenotype. The recent meta-analysis by Effraïmidis et al. collected all current data about p.D313Y and concluded that carriers described in literature had high residual enzyme activity, low frequency of clinical features specific for FD, non-elevated lyso-Gb3/Gb3 concentrations and lack of intracellular Gb3 accumulation in skin and kidney biopsies [18]. The prevalence of the variant in populations with cardiac (0.20%) and renal (0.42%) disease was comparable to the reported frequency in the general population. A possible higher frequency was only observed in neurologic disorders—in stroke patients, 0.59%, and in small fiber neuropathy patients 0.80% [18]. Based on the published data and our findings, we think the possible higher frequency of p.D313Y variant in cerebrovascular disease might represent a low-effect stroke risk factor. If it is contributing to the overall stroke risk in its carriers, or it is an accidental finding, remains to be fully explained by further large populational studies.

Our study observed three more *GLA* variants each in one patient (0.1% of cohort), that are considered likely benign or again with unknown significance and were also reported in the published stroke screening studies—specifically, p.R118C, p.A143T, and p.V199A, for details on patients, see Table 2.

We also observed two variants that are reported for the first time in a stroke cohort or even in FD screening in general - c.89G>A (p.R30K) and c.112A>G (p.R38G). Both patients were elderly females with normal values of Lyso-Gb3, many other stroke risk factors, and no other symptoms specific for FD phenotype; details are given in Table 2. Based on this fact, we considered both variants benign, but at this point, we were not able to test them further.

Ours is also a first study that documents the occurrence of FD in stroke patients in the Czech Republic. In fact, it is the first such study in a population of central or east European descent. However, there were already two national screening studies in the Czech Republic in other typical high-risk groups. The highest prevalence was in patients with unexplained left ventricular hypertrophy, where 4 (4%) out of 100 screened males were diagnosed with FD [19]. In the screening study, which included 3370 hemodialyzed patients, 5 (0.15%) patients were diagnosed with FD [20]. It seems that the frequency observed in stroke patients (0.2%) was the second highest of the three risk groups.

Some limitations of our study are worth mentioning. First, although we aimed to enroll all consecutive patients, we could enroll only patients who were able to consent with inclusion into the study, so a selection bias towards less severe stroke cases cannot be excluded. In terms of testing, we used the sequencing of the *GLA* gene as the most reliable method for screening in all included females. But in males, we at first measured α -Gal-A activity and the biomarker Lyso-Gb3, then we sequenced the patients with abnormal values. Although this approach was used by many previous studies [21–23], it could have consequently underestimated the overall frequency, especially of benign variants in males, as some carriers probably had normal enzyme activity. Future studies should use the *GLA* sequencing also in male patients. Another

limitation of our approach to genetic testing was omitting to test for copy number variants. Our other shortcoming is the level of data details collected for the patients with negative screening. We utilized a stroke care quality database RES-Q. The RES-Q was not designed to collect an abundant amount of data, but it made our study feasible for a larger amount of participating stroke centers. We tried to address this limitation with a detailed data collection in positive cases.

Conclusions

In conclusion, the prevalence of FD is relatively high in unselected Czech adult patients with acute stroke. However, both patients who had a disease-associated *GLA* gene variant were younger than 50 years at the time of stroke. Our results do not support further FD screening of elderly stroke patients in routine clinical practice. Because Fabry disease is a treatable condition, and the diagnosis has implications for other family members, stroke neurologists should be therefore aware of FD as a cause of stroke in younger age groups.

Acknowledgments

We would like to thank the participating stroke centers and to all our patients and their families. We would like to thank to the members of the National Stroke Research Network led by Robert Mikulík [Corresponding email ID: robert.mikulik@fnusa.cz]. We namely thank to the network members: Lenka Sobotková (Department of Neurology Neurology Dpt., Regional Hospital Kladno, Kladno), Zdeněk Topinka (Department of Neurology, Regional Hospital Kolín, Kolín, Czech Republic), Petr Geier (Department of Neurology, Regional Hospital Pardubice, Pardubice, Czech Republic), Jan Dienelt (Department of Neurology, Regional Hospital Liberec, Liberec, Czech Republic), Petr Suchomel (Department of Neurology, Regional Hospital Liberec, Liberec, Czech Republic), Svatopluk Ostrý (Department of Neurology, Hospital České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic), Tereza Loučná (Department of Neurology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague), Petr Janský (Department of Neurology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague), Lubomír Jurák (Department of Neurology, Regional Hospital Liberec, Liberec, Czech Republic) for their contribution to the study.

Author Contributions

Conceptualization: Aleš Tomek, Miroslava Nevšimalová, Roman Herzig, Jiří Neumann, Daniel Václavík, Daniel Šaňák, Ondřej Škoda, Michal Bar, Robert Mikulík, Aleš Linhart.

Data curation: Aleš Tomek, Anna Olšerová, Miroslav Škorňa, Miroslava Nevšimalová, Libor Šimůnek, Roman Herzig, Richard Brzezny, Helena Sobolová, Marta Vachová, Karel Bechyně, Hana Havlíková, Tomáš Prax, Daniel Šaňák, Irena Černíková, Iva Onděčková, Petr Procházka, Jan Rajner, Ondřej Škoda.

Formal analysis: Aleš Tomek, Jaroslava Paulasová Schwabová, Miroslava Nevšimalová, Petr Mikulenka, Jan Bartoník, Robert Mikulík.

Funding acquisition: Aleš Tomek, Ondřej Škoda, Robert Mikulík.

Investigation: Aleš Tomek, Reková Petra, Jaroslava Paulasová Schwabová, Anna Olšerová, Miroslav Škorňa, Miroslava Nevšimalová, Libor Šimůnek, Roman Herzig, Štěpánka Fafetová, Petr Mikulenka, Alena Táboříková, Jiří Neumann, Richard Brzezny, Helena Sobolová, Jan Bartoník, Daniel Václavík, Marta Vachová, Karel Bechyně, Hana Havlíková, Tomáš Prax, Daniel Šaňák, Irena Černíková, Iva Onděčková, Petr Procházka, Jan Rajner, Miroslav

Škoda, Jan Novák, Ondřej Škoda, Michal Bar, Robert Mikulík, Gabriela Dostálová, Aleš Linhart.

Methodology: Aleš Tomek, Reková Petra, Jaroslava Paulasová Schwabová, Roman Herzig, Ondřej Škoda, Michal Bar, Robert Mikulík, Aleš Linhart.

Project administration: Aleš Tomek, Reková Petra, Jaroslava Paulasová Schwabová, Anna Olšerová, Miroslav Škorňa, Miroslava Nevšimalová, Libor Šimůnek, Roman Herzig, Štěpánka Fafejtová, Petr Mikulenka, Alena Tábořková, Jiří Neumann, Richard Brzezny, Helena Sobolová, Jan Bartoník, Daniel Václavík, Marta Vachová, Karel Bechyně, Hana Havlíková, Tomáš Prax, Daniel Šaňák, Irena Černíková, Iva Onděčková, Petr Procházka, Jan Rajner, Miroslav Škoda, Jan Novák, Ondřej Škoda, Michal Bar, Robert Mikulík, Gabriela Dostálová, Aleš Linhart.

Resources: Aleš Tomek, Daniel Šaňák, Michal Bar, Robert Mikulík, Aleš Linhart.

Supervision: Aleš Tomek, Michal Bar, Robert Mikulík.

Validation: Aleš Tomek, Gabriela Dostálová, Aleš Linhart.

Writing – original draft: Aleš Tomek.

Writing – review & editing: Aleš Tomek, Reková Petra, Jaroslava Paulasová Schwabová, Anna Olšerová, Miroslav Škorňa, Miroslava Nevšimalová, Roman Herzig, Štěpánka Fafejtová, Petr Mikulenka, Alena Tábořková, Jiří Neumann, Richard Brzezny, Helena Sobolová, Jan Bartoník, Daniel Václavík, Marta Vachová, Karel Bechyně, Hana Havlíková, Tomáš Prax, Daniel Šaňák, Irena Černíková, Iva Onděčková, Petr Procházka, Jan Rajner, Miroslav Škoda, Jan Novák, Ondřej Škoda, Michal Bar, Robert Mikulík, Gabriela Dostálová, Aleš Linhart.





References

1. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Human Genetics*: Springer Berlin Heidelberg; 2017. p. 665–77. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1779-6> PMID: 28349240
2. Germain D. Fabry disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010.
3. Fellgiebel A, Müller MJ, Ginsberg L. CNS manifestations of Fabry's disease. *Lancet Neurology* 2006. p. 791–5. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70548-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70548-8) PMID: 16914407
4. Mehta A, Ginsberg L. Natural history of the cerebrovascular complications of Fabry disease. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement* 2005. p. 24–7. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2005.tb02106.x> PMID: 15895708
5. Sims K, Politei J, Banikazemi M, Lee P. Stroke in fabry disease frequently occurs before diagnosis and in the absence of other clinical events: Natural history data from the fabry registry. *Stroke* 2009. p. 788–94. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.526293> PMID: 19150871
6. Reisin RC, Romero C, Marchesoni C, Nápoli G, Kishinovsky I, Cáceres G, et al. Brain MRI findings in patients with Fabry disease. *Journal of the Neurological Sciences*: Elsevier B.V.; 2011. p. 41–4.
7. Namdar M. Electrocardiographic Changes and Arrhythmia in Fabry Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 2016. p. 1–6. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2016.00007> PMID: 27047943
8. Kolodny E, Fellgiebel A, Hilz MJ, Sims K, Caruso P, Phan TG, et al. Cerebrovascular involvement in fabry disease: Current status of knowledge. *Stroke* 2015. p. 302–13. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.006283> PMID: 25492902
9. Doheny D, Srinivasan R, Pagant S, Chen B, Yasuda M, Desnick RJ. Fabry Disease: Prevalence of affected males and heterozygotes with pathogenic GLA mutations identified by screening renal, cardiac and stroke clinics, 1995–2017. *Journal of Medical Genetics* 2018. p. 261–8. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-105080> PMID: 29330335

10. Lukas J, Giese AK, Markoff A, Grittner U, Kolodny E, Mascher H, et al. Functional Characterisation of Alpha-Galactosidase A Mutations as a Basis for a New Classification System in Fabry Disease. *PLoS Genetics* 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003632> PMID: 23935525
11. Mikulik R, CVBNSV, PFGASSGZCA, Mishchenko TS, Flomin Y, Milanov IG, Andonova S, Tiu C, et al. Enhancing and accelerating stroke treatment in Eastern European region. *European Stroke Journal* 2020; 5(2):204–12. <https://doi.org/10.1177/2396987319897156> PMID: 32637654
12. Škoda O, Herzig R, Mikulík R, Neumann J, Václavík D, Bar M, et al. Clinical guideline for the diagnostics and treatment of patients with ischemic stroke and transitory ischemic attack—Version 2016. *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie* 2016.
13. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Otterhoff R, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008. p. 2812–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712309105> PMID: 18287059
14. Nagamatsu K, Sekijima Y, Nakamura K, Nakamura K, Hattori K, Ota M, et al. Prevalence of Fabry disease and GLA c.196G>C variant in Japanese stroke patients. *Journal of Human Genetics* 2017. p. 665–70. <https://doi.org/10.1038/jhg.2017.31> PMID: 28275245
15. Nakamura K, Sekijima Y, Nakamura K, Hattori K, Nagamatsu K, Shimizu Y. p.E66Q Mutation in the GLA Gene is Associated with a High Risk of Cerebral Small-Vessel Occlusion in Elderly Japanese Males. *Eur J Neurol* 2014. p. 49–56. <https://doi.org/10.1111/ene.12214> PMID: 23724928
16. Marquardt L, Baker R, Segal H, Burgess AI, Poole D, Hughes DA, et al. Fabry disease in unselected patients with TIA or stroke: Population-based study. *European Journal of Neurology* 2012. p. 1427–32. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2012.03739.x> PMID: 22537551
17. Phan L, Jin Y, Zhang H, Qiang W, Shekhtman E, Shao D, et al. ALFA: Allele Frequency Aggregator. *National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine* 2020.
18. Effraimidis G, Rasmussen ÅK, Bundgaard H, Sørensen SS, Feldt-Rasmussen U. Is the alpha-galactosidase A variant p.Asp313Tyr (p.D313Y) pathogenic for Fabry disease? A systematic review. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2020. p. 1–12. <https://doi.org/10.1002/jimd.12212> PMID: 31958349
19. Paleček T, Honzíkova J, Poupětová H, Vlaskova H, Kuchynka P, Golan L, et al. Prevalence of Fabry disease in male patients with unexplained left ventricular hypertrophy in primary cardiology practice: Prospective Fabry cardiomyopathy screening study (FACSS). *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2014. p. 455–60. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9659-2> PMID: 24173410
20. Merta M, Reiterova J, Ledvinova J, Poupětová H, Dobrovolný R, Ryšavá R, et al. A nationwide blood spot screening study for Fabry disease in the Czech Republic haemodialysis patient population. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2007. p. 179–86. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl528> PMID: 17040996
21. Wozniak MA, Kittner SJ, Tuhirim S, Cole JW, Stem B, Dobbins M, et al. Frequency of unrecognized fabry disease among young european-american and african-american men with first ischemic stroke. *Stroke* 2010. p. 78–81. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.558320> PMID: 20007919
22. Romani I, Borsini W, Nencini P, Morrone A, Ferri L, Frusconi S, et al. De novo Diagnosis of Fabry Disease among Italian Adults with Acute Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: National Stroke Association*; 2015. p. 2588–95. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.07.012> PMID: 26298600
23. Kinoshita N, Hosomi N, Matsushima H, Nakamori M, Yagita Y, Yamawaki T, et al. Screening for Fabry Disease in Japanese Patients with Young-Onset Stroke by Measuring α -Galactosidase A and Globotriaosylsphingosine. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*; 2018. p. 3563–9. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.08.025> PMID: 30201457

Article

Detailed Phenotype of GLA Variants Identified by the Nationwide Neurological Screening of Stroke Patients in the Czech Republic

Petra Reková¹ , Gabriela Dostálová² , David Kemlink^{1,*}, Jaroslava Paulasová Schwabová^{3,4}, Zora Dubská⁵, Manuela Vanecková⁶, Martin Mašek⁶, Ondřej Kodet^{7,8,9} , Helena Poupětová¹⁰, Stella Mazurová¹⁰, Aneta Rajdová¹¹, Eva Vlcková¹¹ , Alena Táboříková¹², Štěpánka Fafejtová¹³, Miroslava Nevsimalová¹⁴, Aleš Linhart² and Aleš Tomek³

- ¹ Department of Neurology and Centre of Clinical Neuroscience, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague, Czech Republic; petra.rekova@vfn.cz
- ² 2nd Department of Medicine—Department of Cardiovascular Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University, 128 08 Prague, Czech Republic; gabriela.dostalova@vfn.cz (G.D.); ales.linhart@vfn.cz (A.L.)
- ³ Department of Neurology, Second Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital in Prague, 150 06 Prague, Czech Republic; jaroslava.schwabova@fnmotol.cz (J.P.S.); ales.tomek@fnmotol.cz (A.T.)
- ⁴ Department of Paediatric Neurology, Second Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital in Prague, 150 06 Prague, Czech Republic
- ⁵ Department of Ophthalmology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague, Czech Republic; zora.dubska@vfn.cz
- ⁶ Department of Radiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague, Czech Republic; manuela.vaneckova@vfn.cz (M.V.); martin.masek@vfn.cz (M.M.)
- ⁷ Department of Dermatovenereology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague, Czech Republic; ondrej.kodet@vfn.cz
- ⁸ Biotechnology and Biomedicine Centre, Academy of Science, Charles University, 252 50 Vestec, Czech Republic
- ⁹ Institute of Anatomy First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, 128 08 Prague, Czech Republic
- ¹⁰ Department of Paediatrics and Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague, Czech Republic; helena.poupetova@vfn.cz (H.P.); stella.mazurova@vfn.cz (S.M.)
- ¹¹ Department of Neurology, Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, 625 00 Brno, Czech Republic; rajdova.aneta@fnbrno.cz (A.R.); vlckova.eva@fnbrno.cz (E.V.)
- ¹² Department of Neurology and Stroke Centre, Country Hospital Chomutov, 430 12 Chomutov, Czech Republic; alena.taborikova@kzcreu
- ¹³ Department of Neurology and Stroke Centre, Hospital Karlovy Vary, 360 01 Karlovy Vary, Czech Republic; stepanka.fafejtova@seznam.cz
- ¹⁴ Department of Neurology, Hospital Ceske Budejovice, 370 01 České Budějovice, Czech Republic; nevsimalova.miroslava@nemcb.cz
- * Correspondence: david.kemlink@vfn.cz; Tel: +420-22-496-5512



Citation: Reková, P.; Dostálová, G.; Kemlink, D.; Paulasová Schwabová, J.; Dubská, Z.; Vanecková, M.; Mašek, M.; Kodet, O.; Poupětová, H.; Mazurová, S.; et al. Detailed Phenotype of GLA Variants Identified by the Nationwide Neurological Screening of Stroke Patients in the Czech Republic. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 3543. <https://doi.org/10.3390/jcm10163543>

Academic Editor: Timo Siepmann

Received: 21 July 2021

Accepted: 10 August 2021

Published: 12 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Fabry disease (FD) is a rare X-linked disorder of glycosphingolipid metabolism caused by pathogenic variants within the alpha-galactosidase A (GLA) gene, often leading to neurological manifestations including stroke. Multiple screening programs seeking GLA variants among stroke survivors lacked detailed phenotype description, making the interpretation of the detected variant's pathogenicity difficult. Here, we describe detailed clinical characteristics of GLA variant carriers identified by a nationwide stroke screening program in the Czech Republic. A total of 23 individuals with 8 different GLA variants were included in the study. A comprehensive diagnostic workup was performed by a team of FD specialists. The investigation led to the suggestion of phenotype reclassification for the G325S mutation from late-onset to classical. A novel variant R30K was found and was classified as a variant of unknown significance (VUS). The typical manifestation in our FD patients was a stroke occurring in the posterior circulation with an accompanying pathological finding in the cerebrospinal fluid. Moreover, we confirmed that cornea verticillata is typically

associated with classical variants. Our findings underline the importance of detailed phenotype description and data sharing in the correct identification of pathogenicity of gene variants detected by high-risk-population screening programs.

Keywords: Fabry disease; GLA gene variants; phenotype; stroke; screening programs; data sharing

1. Introduction

Fabry disease (FD) is a rare inherited X-linked monogenic disorder (OMIM #301500). Variants in the GLA gene result in altered or missing production of a lysosomal enzyme alpha-galactosidase A (α -Gal A; EC 3.2.1.22) [1,2]. Consequently, they lead to an inability to properly hydrolyse the terminal α -galactose moieties, disrupting the glycosphingolipids catabolic pathway and leading to the accumulation of substrates, predominantly globotriaosylceramide, Gb3 [3].

The disease phenotypes are heterogeneous, scaling from severe to asymptomatic cases. The classical phenotype is characterised by multiorgan involvement. Typical manifestations occurring early in life include neuropathic pain, hypohidrosis, gastrointestinal symptoms, development of angiokeratomas and cornea verticillata. The life expectancy of FD patients is limited by cardiac damage, progressive kidney function deterioration or central nervous system involvement [2]. A large group of patients suffer from milder forms of the disease with late-onset phenotypes. The group consists of patients with variously expressed organ manifestations, sometimes limited to one organ, often to the heart [4,5].

At a biochemical level, severely decreased or absent α -GAL A activity and increased level of globotriaosylsphingosine, lyso-Gb3 are hallmarks in males with a classical phenotype [6,7]. The reduction of enzymatic activity and lyso-Gb3 increase is less pronounced in females and later-onset variants. In general, heterozygous women are less affected than hemizygous male patients, in some cases remaining asymptomatic possibly due to skewed X-chromosome inactivation [8].

The classical phenotype incidence of FD is estimated at 1 in 25,000 to 1 in 40,000; the nonclassical seems to be about 10-fold more frequent [9]. The availability of specific therapy and simplified diagnostic methods represented mainly by dry blood spot (DBS) technique testing [10] led to increased efforts to diagnose FD, including newborn [11] and high-risk populations screening programs [12].

A significant increase in the gene variants discovered by the screening has refined FD incidence estimations. Unfortunately, clinical characteristics of detected variants are often missing in the literature. Thus, some variants have been misclassified in terms of pathogenicity [12]. Misclassifications as pathogenic have a psychological impact on patients and their families, administration of unnecessary treatments and can influence research and clinical trials, thus leading to wasting healthcare resources. In contrast, false classification of a variant as benign could disqualify patients from accessing effective therapy. Therefore, it is important to share patients' data, enabling the integration of genetic and clinical information to avoid variant misinterpretations with the necessity of later reclassification.

Here, we describe detailed clinical phenotype characteristics in 16 individuals with GLA gene variants found in our nationwide FD screening study in stroke patients and their 7 relatives.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Patient Selection

We performed a prospective nationwide multicentre study including consecutive stroke patients admitted during a selected period of 3 months in 35 stroke centres in the Czech Republic.

A total of 986 consenting patients presenting with an acute cerebrovascular disease admitted during March 2018, October 2018 and March 2019 were included in the study

irrespective of stroke subtype. We included patients presenting during the study duration with a transient ischemic attack, ischemic stroke, intracerebral haemorrhage, subarachnoid haemorrhage and cerebral venous thrombosis, regardless of stroke aetiology or patient age. There were no other exclusion or inclusion criteria. All patients gave written informed consent to the study. FD was diagnosed using DBS in a stepwise manner: in males, enzymatic activity, lyso-Gb3 quantification, if positive, followed by GLA gene sequencing; and in females, GLA sequencing, followed by lyso-Gb3. The study has led to the identification of 16 index cases with a GLA gene variant. Pedigree analysis and subsequent cascade family genetic testing were performed in all cases except for D313Y variant carriers, leading to the identification of 7 relatives carrying a gene variant. Altogether, these 23 cases represent the current study population. A comprehensive diagnostic workup of all cases to determine FD organ manifestations was performed by a team of FD experts from the Czech National FD centre. All examinations were performed according to the internal protocol of the Czech FD centre for initial disease evaluation, which reflects international recommendations [13].

2.2. FD Organ Manifestation Assessment

2.2.1. Clinical Assessment

Medical history focused on FD-related signs and symptoms was obtained from all study participants. Basic clinical examination, including blood pressure, heart rate, respiratory rate, height and weight measurements, were followed by specialised clinical examinations.

2.2.2. Nervous System Assessment

Structured clinical examination with an emphasis on the presence of typical neurological symptoms of FD was carried out. Recorded symptoms included signs of peripheral neuropathy, gastrointestinal symptoms, changes in sweating, heat and exercise tolerance and cerebrovascular events. To evaluate white matter lesions (WMLs), we performed non-contrast brain magnetic resonance imaging (MRI) using a 3T MRI scanner (MAGNETOM Skyra, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). The MRI protocol comprised of T1W, T2W, FLAIR, DWI and SWI sequences. The occurrences of WMLs were rated according to Fazekas scale [14]. Cerebral blood vessels ultrasound and/or computed tomography or magnetic resonance angiography was carried out. In index patients with pathogenic variants, the evaluation of intraepidermal nerve fibre density in skin biopsy, corneal confocal microscopy and quantitative thermal threshold sensory testing (QST) were performed to evaluate possible small fibre neuropathy (SFN). Cerebrospinal fluid (CSF) analysis has been performed in patients exhibiting some features suggestive of neuroinflammatory disease, including Fabry-associated aseptic meningitis. Routine CSF examination is not a part of FD examination protocol in our Fabry disease centre.

2.2.3. Cardiac Assessment

The cardiac evaluation consisted of detailed physical examination, resting 12-lead electrocardiography (ECG), echocardiography and cardiac MRI. Additionally, heart disease biomarkers, N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide (NT-proBNP) and high-sensitive (hs) troponin I were analysed.

2.2.4. Nephrological Assessment

Serum creatinine and cystatin C were measured. An analysis of total protein in urine and urine albumin-to-creatinine ratio (ACR) were calculated. In patients with albuminuria or proteinuria, the albumin/protein excretion rate (AER, PER) was measured. Estimated glomerular filtration rate (eGFR, mL/min/1.73 m²) was calculated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation with serum creatinine and cystatin (CKD-EPIcreat, CKD-EPIcys formula) [15]. We assigned GFR and albuminuria categories according to Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) [16].

2.2.5. Ophthalmological and Dermatological Assessment

Detailed ophthalmological assessment, including anterior segment examination in a slit lamp and fundoscopy and dermatological examination with an emphasis on the presence of angiokeratomas and capillaroscopy, was performed.

2.2.6. α -Gal A Activity Assay

α -Gal A activities in plasma and leucocytes were measured by fluorometric method according to Mayes [17] as described previously [18]. Results obtained for patients' samples were compared with enzyme activities in our group of FD hemizygotes and heterozygotes (for ranges, see Table 1). In some patients, enzyme activities were determined by the DBS method.

Table 1. Genotype and phenotype characteristics of patients with pathogenic mutation and variants of unknown significance in GLA gene.

No.	Variant	Demographic Information			Biochemical Phenotype			Clinical Phenotype												
		AA Change	Sex	BMI	Age (years)	α-Gal A A. activity			Characteristic Symptoms							Major Organ Involvement				
						DBS nmol/mL/h	Plasma nmol/mL/h	Leukocytes nmol/mg/h	DBS ng/mL	Eye	Skin		Nervous System			Heart				
FD pathogenic GLA mutation																				
10	G21S	M	27	24	<2.5	0.22 [#]	11.3 [#]	19.8	+	+	+	-	-	-	-	-	-			
11	G21S	F	28.4	18	na	na	na	3.6	+	+	-	+	-	-	-	-	-			
20	T4125G	F	26.9	41	na	6.22	33.1	5.5	+	+	-	-	-	-	-	-	-			
21	T4125G	M	16.6	12	na	0.18	0.1	26.9	-	+	-	+	-	-	-	-	-			
22	T4125G	F	20.9	10	na	1.62	26.1	na	-	+	-	-	-	-	-	-	-			
GLA variant of unclear significance or probably benign variant																				
30	R31K	F	30.5	47	na	0.26	64.7	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
31	R31K	F	25.7	52	na	2.64	34.5	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
40	A140T	F	25.1	70	na	1.80	30.1	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
41	A140T	F	31.2	50	na	na	na	1.2	Na	na	na	-	-	-	-	-	-			
50	R26G	F	24.7	78	na	1.7	22.7	1.0	-	-	-	+	-	-	-	-	-			
60	R26K	F	na	87	na	na	na	1.0	Na	na	na	na	na	+	na	-	na			
61	R26K	F	22.9	46	na	3.74	68.5	1.0	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
70	V39A	M	na	78	0.4	na	na	1.3	Na	na	na	na	na	+	na	AF	na			

AA = amino acid; α-GAL A = Alpha-galactosidase A; No. = patient number; BMI = body mass index; y = years at the time of examination in the Fabry disease centre, PNS = peripheral nervous system; CNS = central nervous system; DBS = dry blood spot; AG = angiokeratomas; SFN = small fibre neuropathy; GIT = gastrointestinal symptoms; WML = white matter lesions; FS = Fazekas scale; ECG = electrocardiography; LVE = left ventricular enlargement; LGE = late gadolinium enhancement; GFR = glomerular filtration rate; M = male; F = female; LAH = left anterior hemiblock; AF = atrial fibrillation; + indicates the presence of a finding; - indicates the absence of a finding; na = not available; Alb = albuminuria; [†] category graded by kidney disease improving global outcomes [16]; plus + indicates organ involvement; minus - indicates no pathology. Controls: α-Gal A in leukocytes 25–103 nmol/mg/h, mean value ± SD 59.7 ± 14.6 nmol/mg/h, n = 477, in plasma 2.4–19.4 nmol/mL/h, mean value ± SD 6.1 ± 2.8 nmol/mL/h, n = 322, in DBS 15.3 μmol/L/h; lysoGb3 in DBS 1.8 ng/mL. [#] Enzyme activity assessment while taking migalastat, pre-treatment activity available from DBS.

3. Results

The study included 23 individuals (16 index patients and 7 positively tested family members) carrying 8 different GLA gene variants. Pathogenic mutations were detected in 2 index patients and their 3 relatives, and VUS or likely benign variants in 14 index patients and their 4 relatives.

Eleven out of the sixteen index patients underwent a comprehensive examination for possible FD organ manifestations. Three index patients underwent incomplete (only cardiac and renal) assessments. Two index patients refused the examination.

Out of the seven positively tested relatives, six agreed to the complex clinical examination. Stroke risk factors of index patients are shown in Table 2.

Table 2. The major risk factors for ischaemic stroke in index patients.

Nr.	Mutation Characteristics		Nonmodifiable Risk Factors			Modifiable Risk Factors				
	cDNA Change	Amino Acid Change	Sex	Age (years)	Hyper Tension	Diabetes	Heart Disease	Dyslipidemia	Previous Stroke or TIA	Smoking
Pathological GLA variants										
1.0	c.973G > A	p.Gly328Ser	M	34	-	-	-	-	-	+
2.0	c.1235_1236delCT	p.Thr412Serfs*?	F	40	-	-	-	-	-	+
GLA variants of unknown significance or probably benign										
3.0	c.352C > T	p.Arg118Cys	F	47	+	-	-	-	-	-
4.0	c.427G > A	p.Ala143Thr	F	70	+	-	-	+	-	-
5.0	c.112A > G	p.Arg38Lys	F	78	+	-	AF	-	+	-
6.0	c.89G > A	p.Arg30Lys	F	83	+	-	-	-	-	-
7.0	c.596T > C	p.Val199Ala	M	78	-	-	IHD, AF	-	-	+
8.0#	c.937G > T	p.Asp313Tyr	M	41	+	-	-	-	-	-
9.0	c.937G > T	p.Asp313Tyr	M	54	-	-	PFO	+	-	+
10.0	c.937G > T	p.Asp313Tyr	F	44	-	-	-	-	-	-
11.0	c.937G > T	p.Asp313Tyr	M	64	+	-	IHD	+	-	-
12.0	c.937G > T	p.Asp313Tyr	F	83	+	+	IHD	+	-	-
13.0	c.937G > T	p.Asp313Tyr	F	72	+	-	IHD	-	-	-
14.0	c.937G > T	p.Asp313Tyr	F	71	+	-	PFO	+	-	-
15.0	c.937G > T	p.Asp313Tyr	M	59	+	-	-	-	-	+
16.0	c.937G > T	p.Asp313Tyr	F	44	-	-	-	-	+	-

Nr = patient number; y = years, at the time of cerebrovascular event; M = male; F = female; TIA = transient ischaemic attack; AF = atrial fibrillation; IHD = ischaemic heart disease; PFO = patent foramen ovale; + indicates the presence of a finding; - indicates the absence of a finding; # the patient with basal ganglia haemorrhage.

3.1. Pathogenic Mutation

A summary of FD characteristic symptoms and major organ involvement in individuals with pathogenic mutations is given in Table 1.

3.1.1. Index Patients

FD was diagnosed in two index individuals carrying pathogenic variants, a 34-year-old male (c.973G > A, G325S, patient 1.0.) and a 41-year-old female (c.1235_1236delCT, T412Sfs*?, patient 2.0.). Both variants were associated with the classical FD phenotype. The first presentation of FD in both probands was posterior circulation lacunar infarction (Figures 1 and 2). Apart from lacunar infarcts, brain MRI did not provide evidence of any other pathology, not even WMLs. CSF analysis proved mild pleiocytosis in both. The cell count was 35 and 32 elements per mm³, respectively. A detailed examination of the CSF did not reveal the infectious cause of pleiocytosis. Oligoclonal bands were negative.

Further examination revealed the presence of FD-characteristic ocular findings. The renal and cardiac assessments did not reveal any pathology.

Although the man did not complain about any neuropathic sensory symptoms or pain, a further detailed examination of the peripheral nervous system (PNS) verified functional and structural abnormalities due to an isolated small fibre neuropathy. Skin biopsy revealed intraepidermal nerve fibre loss; confocal corneal microscopy demonstrated a decrease in corneal innervation, and abnormal QST confirmed a functional impairment of both A-delta and C fibres.

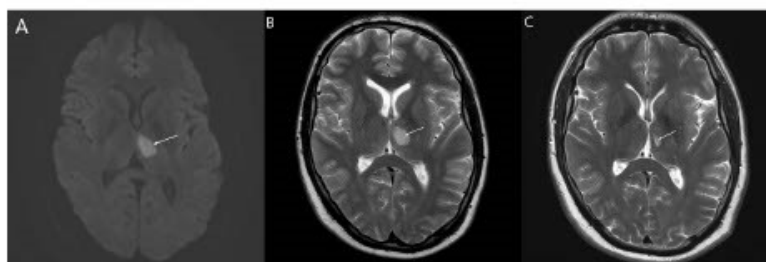


Figure 1. Axial MRI scans illustrate an infarct in the left medial thalamus (white arrows) of the patient 1.0 on day 3 post-stroke (A,B) and at 3 months post-stroke (C). (A) Diffusion-weighted imaging shows large lesion with restricted diffusion in the thalamus. (B) T2-weighted imaging shows hypersignal lesion; (C) After 3 months there is smaller hypersignal lesion as residual lesion.

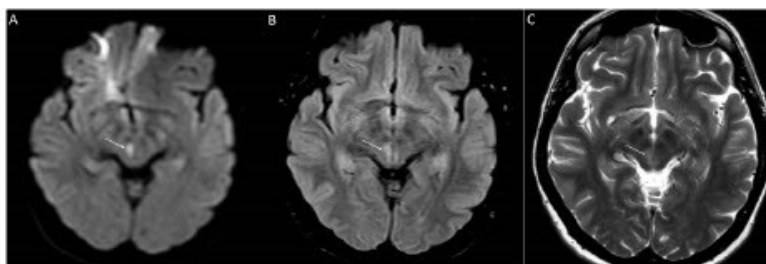


Figure 2. Axial MRI illustrates a lacunar infarct in the left midbrain of the patient 2.0 (white arrows) on day 3 post-stroke (A–C). (A) Diffusion-weighted imaging shows hypersignal lesion in midbrain (restricted diffusion). (B) Fluid-attenuated inversion recovery demonstrates hypersignal lesion. (C) T2-weighted imaging shows hypersignal lesion.

3.1.2. Family Members

In the first family, FD was diagnosed in the proband's 58-year-old mother (patient 1.1, G325S). She presented with skin and eye manifestations of FD. She did not suffer from neuropathic pain at present nor in the past. Major organ investigation revealed nonspecific brain WMLs (Fazekas 1).

In the second family, pathogenic mutations were detected in proband's 12-year-old son and 10-year-old daughter (patients 2.1., 2.2., T412Sfs *?). The 12-year-old boy (patient 2.1.) presented with a typical triad of FD classical phenotype including ocular, skin and PNS manifestation: incipient cornea verticillata, angiokeratomas in typical localisation (periumbilical, buttocks and right thigh), painful episodic acroparesthesias and abdominal pain. Renal, heart and brain assessment did not show any abnormality. In his sister, a 10-year-old girl (patient 2.2.), we did not detect any abnormal finding apart from incipient cornea verticillata.

3.2. Variants of Unknown Significance and Likely Benign Variants

Assessment results of identified cases with VUS or likely benign variants (except D313Y) are depicted in Table 3. In one case, we identified a variant c.112 A > G, p.R38G. The patient, a 78-year-old woman (patient 5.0), presented with multiple angiokeratomas with a typical abdominal distribution. No other characteristic symptoms were found. Major organ examination showed mild renal impairment—PER of 0.19 g/24 h, slightly increased ACR of 3.74 g/mol and a mildly decreased eGFR 66 mL/min/1.73 m² (CKD-EPI_{creat}), 75 mL/min/1.73 m² (CKD-EPI_{cys}). Cardiological examination revealed heart failure with preserved ejection fraction, atrial fibrillation, postcapillary pulmonary hypertension with mild right heart failure signs (echo signs of increased left ventricular filling pressures, elevated NT-proBNP—1926 ng/L); hs troponin was normal. Left ventricular hypertrophy (LVH) was not observed.

A previous stroke at the age of 40 was revealed in the patient's medical history. The suspected cause was embolic caused by known atrial fibrillation with ineffective anticoagulation at the time of the index event.

The proband, a 47-year-old female (patient 3.0.), a variant c.352C > T, R118C carrier, had mild brain involvement—WMLs, mild proteinuria 0.20 g/L, PER 0.28 g/24 h with normal ACR and normal AER. Echocardiography detected a borderline LVH. No typical FD symptoms were revealed. Examination of her sister (52 years old, patient 3.1.) showed partially reduced α -GAL A activity, mild nonspecific brain and renal involvement (WMLs, eGFR CKD-EPI_{cys}, 84.6 mL/min/1.73 m²). A 3-month episodic burning pain of her feet, that occurred in the context of a stressful personal situation, was revealed in the patient's history.

In one case, a 70-year-old female patient (patient 4.0.), we identified a variant c.427G > A, A143T. There were no clinical signs or symptoms of possible FD, except for brain WMLs on MRI. In her 50-year-old daughter (patient 4.1.), we diagnosed a mild proteinuria 0.28 g/24 h, 0.14 g/L, ACR and AER were normal. The activities of α -GAL A in both leukocytes and plasma were overlapping with healthy controls values.

A male patient carrying the variant c.596T > C, V199A did not give his consent to further investigations due to his age and associated diseases (atrial fibrillation, kidney cancer, prostate cancer).

A total of eight individuals carrying c.937G > T, D313Y variants underwent a clinical workup in specialised FD centre; two of them only agreed to a partial examination. Consent was not acquired in two individuals with index stroke (one refused investigation, one died). A daughter of a diseased 69-year-old female patient, who died of stroke complications, was found during family screening. Results are given in Table 3. Of note, none of the patients had relevant cardiac involvement, and minimal changes were observed in renal function in all but one patient (an 83 years-old female, patient 12.0) who refused further investigations.

Table 3. Phenotype characteristics of patients with variant c.937G > T, p.Asp 313Iyr (D313Y).

Nr	Demographic Information				Phenotype														
	Sex	BMI	Age (years)	Lyso-Gb ₃ (ng/ml)	Characteristic Symptoms						Nervous System				Major Organ Involvement				
					Eyes		Skin		PNS		CNS		Heart		Kidney †				
					Tortuous Vessels	Cornea Vericillata	Fabry Cataract	AG	Sweating	Neuropathic Pain	GIT	Stroke	WML/FS	Other	ECG	LVH	LGE	alb	GFR
8.0	M	25.9	43	1.6	+	-	-	-	-	-	-	+	+2	-	LAH	-	-	A1	G2
9.0	M	26.7	54	1.0	-	-	-	-	-	-	-	+	+1	-	-	-	na	A2	G1
10.0	F	35.9	44	1.0	+	-	-	-	-	-	-	+	-/0	MSA	-	-	na	A1	G2
11.0	M	25.8	64	1.1	+	+	-	-	-	-	-	+	+2	MSA, MCA stenosis	IRBBB	-	na	A1	G1
12.0	F	n.d.	83	1.4	na	na	na	-	-	-	-	+	na	-	-	-	na	na	G3b
13.0	F	n.d.	72	0.9	na	-	na	na	na	na	na	+	na	na	na	na	na	na	na
13.1	F	36.9	47	1.1	-	-	-	-	-	+	-	-	-/0	-	-	-	na	A1	G1
14.0	F	31.9	71	1.2	-	-	-	-	-	-	-	+	-/0	epilepsy	-	-	na	A1	G1
15.0	M	38.4	59	1.1	na	na	na	na	na	na	na	+	na	na	na	-	na	na	G1
16.0	F	17.4	44	1.1	na	na	na	-	-	-	-	+	na	-	na	na	na	na	G1

Nr = patient number; BMI = body mass index; y = years at the time of examination in the Fabry disease centre; PNS = peripheral nervous system; CNS = central nervous system; AG = angiokeratomas; GIT = gastrointestinal symptoms; WML = white matter lesions; FS = Fazekas scale; MSA = mild sleep apnea; MCA = middle cerebral artery; ECG = electrocardiography; LVH = left ventricular enlargement; LGE = late gadolinium enhancement; GFR = glomerular filtration rate; M = male; F = female; LAH = left anterior hemiblock; IRBBB = incomplete right bundle branch block; na = not available; alb = albuminuria; † category graded by kidney disease improving global outcomes [16]; plus + indicates organ involvement; minus - indicates no pathology.

3.3. Newly Identified Variant

A newly identified variant c.89G > A, p.R30K, was found in an 82-year-old woman (patient 6.0) with a lacunar posterior circulation ischaemic stroke. The patient herself refused further examination in an FD-specialised centre. Her 46-year-old daughter (patient 6.1) agreed to both genetic and clinical examinations, which revealed neither characteristic FD signs nor heart or brain pathology. However, renal investigation detected a slightly elevated AER 31.42 mg/24 h and ACR of 4.47 mg/mmol. Ophthalmological examination revealed very subtle signs of possible cornea verticillata. Enzyme activity was not reduced. Reconsidering the previously given consent and referring to the fact that there are no symptoms of the disease, she refused genetic testing and clinical examination of her children.

3.4. Further Management

After the evaluation of our cohort, we initiated therapy with migalastat in patients 1.0 and 1.1. As the variant T412Sfs*? is not amenable for chaperone therapy, patients 2.0 and 2.1. are receiving enzyme replacement therapy. All patients (including asymptomatic family members and VUS carriers) remain under the care of the Czech FD centre, receiving a routine follow up for major organ involvement.

4. Discussion

FD in patients with cerebrovascular events has been assessed by different authors since 2005 [19]. However, detailed descriptions of phenotypic manifestations of detected variants are scarce in the literature. Since the initial misinterpretation of a genetic variant may impact a large group of patients, we carefully analysed organ manifestations of FD not only in known pathogenic mutations but in all variants detected in our screening. A total of 23 individuals with 8 different GLA variants were included in the study.

Both pathogenic mutations found (G325S, T412Sfs*?) have been previously described in the literature. The G325S mutation was associated with a nonclassical phenotype, while T412Sfs*? is known to cause the classical FD phenotype [20].

In G325S, only limited biochemical and clinical phenotype data were published. Lukas et al. provided biochemical phenotype characteristics of the mutated gene product, its pharmacological chaperone responsivity and described elevated lyso-Gb3, suggesting this mutation as pathogenic [21,22]. In a study by Kokotis et al. evaluating sweat gland innervation, a patient with the G325S variant was included. However, the phenotypic expression of the patient was not reported in detail [23]. The supporting evidence of the pathogenicity of the variant comes from another male patient with G325S variant visiting our FD centre, and not included in the cohort described in this paper. This 56-year-old gentleman suffers from severe multiorgan involvement (he underwent a kidney transplant, has severe LVH and had a transient ischaemic attack at the age of 49). His pre-treatment α -Gal A activity in leukocytes was severely depressed, reaching 1.1. nmol/mg/h (1.8% of mean value of our controls).

At the time of the diagnosis, our index patient with G325S mutation (patient 1.0.) showed biochemically low enzyme activity and high levels of lyso-Gb3. Detailed examination revealed a full spectrum of ocular pathology, small fibre neuropathy (although the patient did not report any sensory symptoms either at present or in his medical history, including childhood) and major organ complications. In our experience, it is not uncommon that FD patients do not report painful episodes (even in response to targeted questions) despite the clear presence of SFN on functional and structural examination methods. This may lead to a variant misclassification or to a delayed diagnosis.

Based on the information obtained from a detailed examination of patients with the G325S variant, we concluded that the G325S mutation might result in a classical phenotype.

As compared to G325S, clinical descriptions of the T412Sfs*? phenotype in the literature are more frequent. The mutation is known to cause a classical phenotype. In our study,

clinical symptoms of patient 2.0, together with typical painful crises that appeared in the patient's 12-year-old son, confirm pathogenicity associated with the classic FD phenotype.

Interestingly, there was a mild pleocytosis discovered in CSF analysis in both index patients with the two pathogenic variants. CSF testing in patients with FD is not routinely performed. There have been reports in the literature describing "aseptic" or "chronic" meningitis in individual cases with FD suffering from neurological symptoms since 1985 [24]. Mild to moderate CSF pleocytosis corresponding to meningitis, either associated with headache and fever or not, have been documented. Simultaneous findings of lacunar infarctions predominantly in the posterior circulation, similar to in our study, have almost always been reported [24–27]. In contrast, in patients with ischaemic stroke without FD, pleocytosis is not commonly detected, although a very slight increase of white blood cells in the CSF may be seen [28]. Since aseptic meningitis is considered a rare phenotypic manifestation of FD, elevated cells in CSF may be a misleading feature when making the correct differential diagnosis against inflammatory diseases of the nervous system. However, as the findings in our patients show, after excluding inflammatory diseases, the association of a lacunar stroke with the CSF findings corresponding to aseptic meningitis in a young person should always lead to consideration of FD, whether CSF abnormalities are found in the early post-ischaemic period or detected later.

There is an ongoing debate about the pathogenicity and phenotypic manifestation of several VUS, including variants found in our cohort: R118C, A143T and D313Y.

The R118C variant was primarily identified in neonatal screening in 2004 [29]. Based on the biochemical characteristics of the enzyme, the later-onset FD phenotype was predicted [11]. Initially, this variant was considered pathogenic, leading to its inclusion in calculations of FD prevalence in young stroke patients screening [30]. Later, the variant was reclassified at VUS [29], although recently emerging information is in favour of the original classification [31].

The A143T variant was first described in 1997 by Eng et al. In their study, the variant was found in a 2-month-old child. The biochemical phenotype showed reduced α -GAL activity in the proband and his mother; clinical phenotype in the infant could not be evaluated, and his mother showed no signs of FD. Similarly, there was no history of FD in the family. The variant phenotypic expression was concluded by the authors as being unknown [32]. Later, Spada et al. assumed the A143T genotype leads to late-onset end-stage nephropathy [33]. Since then, the variant has been classified as a later-onset pathogenic mutation [11,34–38], including screening studies in stroke patients [39]. Biochemically, the variant carriers have been repeatedly shown to express decreased α -GAL A activity, both when assessed in vitro or/and in plasma or leucocytes analysis [11,34,35,40–42]. Based on the clinical information, the variant has been reclassified [40], and although it is still a matter of debate, it is currently referred to be VUS or a probably benign variant [12,43].

In our group, we identified three females (patients 3.0, 3.1, 4.0) with R118C and one with A143T (patient 4.1) variants. They presented with mild nonspecific symptoms (see Table 1), although in one case, we recorded a time-limited episode of paroxysmal neuropathic pain, similar to those seen in typical FD acroparesthesias. The activity of α -GAL A obtained, both in plasma and leukocytes, were lower as compared to our group of FD heterozygous women. Regrettably, we did not obtain consent to a detailed examination in R118C male relatives. In A143T, there were no living male members in the close family. In addition, patient 4.1. did not complete the investigation due to the COVID-19 pandemic.

Likewise, the clinical significance of variant D313Y has become a matter of controversy since it was first reported [44], especially after a duplicate missense GLA mutation has been detected in the same allele in a patient with a typical FD form [45,46]. However, a high residual D313Y enzyme activity and its dependence on pH (resulting in plasma pseudodeficiency [47]), normal values of lyso-Gb3 [48,49] and cases without clinical manifestations [47,49] indicate D313Y to be a benign variant.

Phenotyping in our cohort of patients with D313Y revealed symptoms attributable to FD in two individuals (Table 3). Patients 11.0 presented with cornea verticillata, and patient

13.1 suffered from neuropathic pain. After a detailed examination, patient 13.1. was diagnosed with coeliac disease. Thus, neuropathic pain might be explained by gluten-associated neuropathy [50]. In contrast, there was no clear explanation for cornea verticillata in the patient 11.0. Although some in vitro data attribute a potential risk to amlodipine which was taken by the patient [51], the risk of cornea verticillata with this drug was never reported.

In general, the clinical significance of some variants that most experts currently consider to be probably benign, especially R118C, A143T and D313Y, has been the subject of debate for years, and their association with FD still raises numerous questions. The lack of detectable lipid accumulation (negative biopsy of the kidneys, heart) strongly supports this classification. Nevertheless, a higher concentration of unmetabolised substrate, which does not yet lead to the formation of detectable inclusions, may already affect the balance of biochemical processes within the cell. Reduced enzyme activity, which is sufficient for metabolic processes under physiological conditions, may no longer be sufficient in situations with an increased demand on the metabolic glycosphingolipids turnover. Hypothetically, a partial and/or intermittent blockade of the catabolic pathway with subsequent accumulation of Gb3 can alter metabolites flow with an effect on other biochemical processes in the cell (for example, redistribution of glycosphingolipids in other subcellular districts) [52,53] without the formation of typical inclusions. Thus, hypothetically, there might be a possibility that transient, paroxysmal burning feet pain in patients 3.1 with the R118C variant during periods of severe stress might be associated with the GLA variant. Moreover, it should be noted that the determination of α -GAL activity was performed in plasma and leukocytes in vitro. In vivo catalytic α -GAL A activity may be different and may show cell-to-cell variability [54].

Many other genetical–biochemical–environmental interactions may then contribute to the fact that a benign variant in a particular individual may, under certain circumstances, act as a risk factor contributing to organ manifestation (e.g., cerebrovascular events). On the other hand, in some cases, storage has been described in VUS carriers [31,55]. Multilayer inclusions may be caused by drug-induced phospholipidosis (DIP). Some preparations are known to lead to lysosomal deposition and to clinical manifestations resembling symptoms of FD, e.g., cornea verticillata [56,57]. Amiodarone and aminoquinolines are known to cause cornea verticillata by means of DIP. Although the DIP potential has also been demonstrated in commonly used carvedilol and amlodipine in vitro, their association with cornea verticillata is not known [51]. Nevertheless, a precise medical history is essential also in individuals who have been found to be carriers of the variant in the GLA gene and suffer from cornea verticillata [58]. In our group, all patients with pathological mutations, including children, presented with the cornea verticillata. Among other individuals, patient 6.1 (R30K) presented with very subtle findings, requiring additional eye monitoring.

Some limitations of the study should be noted. The different screening methods were used for males and females in stroke patients. The GLA gene sequencing was performed only in males with abnormal values of α -Gal-A activity and/or elevated Lyso-Gb3. In contrast, all samples obtained from female patients were sequenced. This may lead to underestimated frequency of several variants of unknown significance and benign variants in hemizygous males in whom a high residual enzyme activity is preserved and lyso-Gb3 remains low. Future studies aiming to detect the whole spectrum of genetic variants should also use GLA sequencing in male patients.

5. Conclusions

In conclusion, we present a descriptive clinical study including 23 patients (16 suffering from stroke) with 8 different GLA variants. We propose to reclassify the pathogenic variant G325S from causing late-onset FD type to a variant resulting in the classical one. The newly identified GLA variant R30K could not be accurately assessed for pathogenicity. The combination of a lacunar stroke in a young person with the CSF finding of aseptic meningitis is highly suggestive of FD.

Taking into account the availability of specific FD treatment, it is of great importance to share patients' data. In order to better characterise VUS, not only probands but also all asymptomatic variant carriers diagnosed by family screening should be followed and evaluated prospectively.

These data, in the future, will help to distinguish symptoms attributable to FD from nonspecific comorbidities in benign GLA variants carriers.

Author Contributions: Conceptualisation, P.R., G.D., A.L. and A.T. (Aleš Tomek); Data curation, P.R., D.K. and A.T. (Aleš Tomek); Formal analysis P.R. and D.K.; Funding acquisition, P.R. and A.T. (Aleš Tomek); Investigation, P.R., G.D., J.P.S., Z.D., M.V., M.M., O.K., H.P., S.M., A.R., E.V., A.T. (Alena Táboříková), Š.F., M.N. and A.T. (Aleš Tomek); Methodology, P.R., G.D., A.L. and A.T. (Aleš Tomek) Project administration, P.R. and G.D., Supervision, D.K. and A.L. Writing—original draft, P.R. Writing—review and editing, G.D., D.K., J.P.S., Z.D., M.V., M.M., O.K., H.P., S.M., A.R., E.V., A.T. (Alena Táboříková), Š.F., M.N., A.L. and A.T. (Aleš Tomek). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partially funded by the Czech Ministry of Health, grant number MZCZ-DRO-VFN64165. The APC was funded by the Open Access Fund of the General University Hospital in Prague. Required specific FD diagnostic laboratory tests (genetic testing, α -Galactosidase A activity determined by dry blood spot technique (only males) and lyso-Gb3 analysis) were funded through a grant from Takeda (formerly Shire) to the Czech Neurological Society. All other examinations of patients were covered by general health insurance. The authors confirm independence from the sponsors; the content of the article has not been influenced by the sponsors.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee (10/18-S-IV, 01/21-S-IV) and was carried out in accordance with the institutional and national ethical standards.

Informed Consent Statement: Prior to the enrolment in the study, written consent was obtained from all individuals involved in the study. There were no animal experiments in connection with this study.

Data Availability Statement: The data supporting reported results of this study are available upon reasonable request to the corresponding author.

Acknowledgments: We are grateful to all patients and their relatives for their participation in this study. We would like to thank Soňa Bíková (Department of Neurology and Stroke Centre, Ústí nad Labem, Czech Republic); Miroslav Škorňa (Department of Neurology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic); Jan Bartoník (Department of Neurology Neurology Dpt., Regional Hospital of Tomáš Baťa, Zlín, Czech Republic) and Ondřej Škoda (Department of Neurology, Hospital Jihlava, Jihlava, Czech Republic) for their contribution to the study.

Conflicts of Interest: P.R. has received speaker fees and a travel grant from Takeda (formerly Shire HGT), and a symposium reimbursement from Amicus Therapeutics. G.B. has received honoraria and fees for consulting from Amicus Therapeutics, Sanofi Genzyme and Takeda (formerly Shire HGT). J.P.S. has received speaker fees and a travel grant from Takeda (formerly Shire HGT). E.V. has received speaker fees from Takeda (formerly Shire HGT) and Alnylam. A.L. is a member of the Fabry Registry Board. He has received honoraria and fees for consulting from Amicus Therapeutics, Sanofi Genzyme and Shire HGT. A.T. (Aleš Tomek) has received speaker fees from Takeda (formerly Shire HGT). Z.D. has received a travel grant from Takeda (formerly Shire HGT) and symposium reimbursement from Amicus Therapeutics. M.V. has received speaker honoraria and travel grants from Sanofi/Genzyme. D.K., M.M., O.K., H.P., A.E., A.T. (Alena Táboříková), Š.F. and M.N. declare no conflict of interest.

References



1. Brady, R.O.; Gal, A.E.; Bradley, R.M.; Martensson, E.; Warshaw, A.L.; Laster, L. Enzymatic Defect in Fabry's Disease. Ceramidetrihexosidase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **1967**, *276*, 1163–1167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Germain, D.P. Fabry disease. *Orphanet J. Rare Dis.* **2010**, *5*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Sweeley, C.C.; Klionsky, B. Fabry's disease: Classification as a Sphingolipidosis and Partial Characterization of a Novel Glycolipid. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 3148–3150. [[CrossRef](#)]
4. Elleder, M.; Dorazilová, V.; Bradová, V.; Bělohávek, M.; Král, V.; Choura, M.; Buděšínský, M.; Harzer, K. Fabry's disease with isolated disease of the cardiac muscle, manifesting as hypertrophic cardiomyopathy. *Cas. Lek. Cesk.* **1990**, *129*, 369–372. [[PubMed](#)]
5. Nakao, S.; Takenaka, T.; Maeda, M.; Kodama, C.; Tanaka, A.; Tahara, M.; Yoshida, A.; Kuriyama, M.; Hayashibe, H.; Sakuraba, H.; et al. An Atypical Variant of Fabry's Disease in Men with Left Ventricular Hypertrophy. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *333*, 288–293. [[CrossRef](#)]
6. Aerts, J.M.; Groener, J.E.; Kuiper, S.; Donker-Koopman, W.E.; Strijland, A.; Ottenhoff, R.; van Roomen, C.; Mirzaian, M.; Wijburg, F.A.; Linthorst, G.E.; et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2812–2817. [[CrossRef](#)]
7. Aerts, M.; Wanner, C.; Hughes, D.; Mehta, A.; Oder, D.; Watkinson, O.T.; Elliott, P.M.; Linthorst, G.E.; Wijburg, F.A.; Biegstraaten, M.; et al. Characterization of Classical and Nonclassical Fabry Disease: A Multicenter Study. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *28*, 1631–1641. [[CrossRef](#)]
8. Echevarria, L.; Benistan, K.; Toussaint, A.; Dubourg, O.; Hagege, A.A.; Eladari, D.; Jabbour, F.; Beldjord, C.; De Mazancourt, P.; Germain, D.P. X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. *Clin. Genet.* **2016**, *89*, 44–54. [[CrossRef](#)]
9. Desnick, R.J. Chapter 38—Fabry Disease: α -Galactosidase A Deficiency. In *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease*, 5th ed.; Rosenberg, R.N., Pascual, J.M., Eds.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2015; pp. 419–430.
10. Chamoles, N.A.; Blanco, M.; Gaggioli, D. Fabry disease: Enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **2001**, *308*, 195–196. [[CrossRef](#)]
11. Spada, M.; Pagliardini, S.; Yasuda, M.; Tukul, T.; Thiagarajan, G.; Sakuraba, H.; Ponzzone, A.; Desnick, R.J. High Incidence of Later-Onset Fabry Disease Revealed by Newborn Screening. *Am. J. Hum. Genet.* **2006**, *79*, 31–40. [[CrossRef](#)]
12. Doheny, D.; Srinivasan, R.; Pagant, S.; Chen, B.; Yasuda, M.; Desnick, R.J. Fabry Disease: Prevalence of affected males and heterozygotes with pathogenic GLA mutations identified by screening renal, cardiac and stroke clinics, 1995–2017. *J. Med. Genet.* **2018**, *55*, 261–268. [[CrossRef](#)]
13. Ortiz, A.; Germain, D.P.; Desnick, R.J.; Politei, J.; Mauer, M.; Burlina, A.; Eng, C.; Hopkin, R.J.; Laney, D.; Linhart, A.; et al. Fabry disease revisited: Management and treatment recommendations for adult patients. *Mol. Genet. Metab.* **2018**, *123*, 416–427. [[CrossRef](#)]
14. Fazekas, F.; Chawluk, J.B.; Alavi, A.; Hurtig, H.I.; Zimmerman, R.A. MR signal abnormalities at 1.5 T in Alzheimer's dementia and normal aging. *AJR Am. J. Roentgenol.* **1987**, *149*, 351–356. [[CrossRef](#)]
15. Levey, A.S.; Stevens, L.A.; Schmid, C.H.; Zhang, Y.L.; Castro, A.F., 3rd; Feldman, H.I.; Kusek, J.W.; Eggers, P.; Van Lente, E.; Greene, T.; et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann. Intern. Med.* **2009**, *150*, 604–612. [[CrossRef](#)]
16. Levin, A.; Stevens, P.E.; Bilous, R.W.; Coresh, J.; De Francisco, A.L.; De Jong, P.E.; Griffith, K.E.; Hemmelgarn, B.R.; Iseki, K.; Lamb, E.J.; et al. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int. Suppl.* **2013**, *3*, 1–150.
17. Mayes, J.S.; Scheefer, J.B.; Sifers, R.N.; Donaldson, M.L. Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **1981**, *112*, 247–251. [[CrossRef](#)]
18. Paleček, T.; Horzík, J.; Poupětová, H.; Vlaskova, H.; Kuchynka, P.; Golán, L.; Magage, S.; Linhart, A. Prevalence of Fabry disease in male patients with unexplained left ventricular hypertrophy in primary cardiology practice: Prospective Fabry cardiomyopathy screening study (FACSS). *J. Inher. Metab. Dis.* **2014**, *37*, 455–460. [[CrossRef](#)]
19. Rolfs, A.; Böttcher, T.; Zschiesche, M.; Morris, P.; Winchester, B.; Bauer, P.; Walter, U.; Mix, E.; Löhr, M.; Harzer, K.; et al. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: A prospective study. *Lancet* **2005**, *366*, 1794–1796. [[CrossRef](#)]
20. International Fabry Disease Genotype-Phenotype Database (dbFGP). Available online: <http://www.dbfgp.org/dbFGP/fabry> (accessed on 24 November 2020).
21. Lukas, J.; Giese, A.K.; Markoff, A.; Grittner, U.; Kolodny, E.; Mascher, H.; Lackner, K.J.; Meyer, W.; Wree, P.; Saviouk, V.; et al. Functional Characterisation of Alpha-Galactosidase A Mutations as a Basis for a New Classification System in Fabry Disease. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lukas, J.; Cimmaruta, C.; Liguori, L.; Pantoom, S.; Iwanov, K.; Petters, J.; Hund, C.; Bunschowski, M.; Hermann, A.; Cubellis, M.V.; et al. Assessment of Gene Variant Amenability for Pharmacological Chaperone Therapy with 1-Deoxygalactonojirimycin in Fabry Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kokotis, P.; Üçeyler, N.; Werner, C.; Tsivgoulis, G.; Papanikola, N.; Katsanos, A.H.; Karandreas, N.; Sommer, C. Quantification of sweat gland innervation in patients with Fabry disease: A case-control study. *J. Neurol. Sci.* **2018**, *390*, 135–138. [[CrossRef](#)]
24. Dubost, J.J.; Viallard, L.L.; Sauvezie, B. Chronic meningitis in Fabry's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1985**, *48*, 714–715. [[CrossRef](#)]
25. Uyama, E.; Ueno, N.; Uchino, M.; Narahara, T.; Owada, M.; Taketomi, T.; Ando, M. Headache Associated with Aseptic Meningeal Reaction as Clinical Onset of Fabry's Disease. *Headache* **1995**, *35*, 498–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Schreiber, W.; Udvardi, A.; Kristoferitsch, W. Chronic meningitis and lacunar stroke in Fabry disease. *J. Neurol.* **2007**, *254*, 1447–1449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Lidove, O.; Chauveheid, M.P.; Caillaud, C.; Froissart, R.; Benoist, L.; Alamowitch, S.; Doan, S.; Szalat, R.; Baumann, N.; Alexandra, J.F.; et al. Aseptic meningitis and ischaemic stroke in Fabry disease. *Int. J. Clin. Pract.* **2009**, *63*, 1663–1667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Schulte-Mecklenbeck, A.; Kleffner, I.; Beuker, C.; Wirth, T.; Hartwig, M.; Schmidt-Pogoda, A.; Klotz, L.; Hansen, W.; Wiendl, H.; Meuth, S.G.; et al. Immunophenotyping of cerebrospinal fluid cells in ischaemic stroke. *Eur. J. Neurol.* **2019**, *26*, 919–926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ferreira, S.; Ortiz, A.; Germain, D.P.; Viana-Baptista, M.; Caldeira-Gomes, A.; Camprecios, M.; Fenollar-Cortés, M.; Gallegos-Villalobos, Á.; Garcia, D.; Garcia-Robles, J.A.; et al. The alpha-galactosidase A p.Arg118Cys variant does not cause a Fabry disease phenotype: Data from individual patients and family studies. *Mol. Genet. Metab.* **2015**, *114*, 248–258. [[CrossRef](#)]
30. Rolfs, A.; Fazeekas, F.; Grittner, U.; Dichgans, M.; Martus, P.; Holzhausen, M.; Böttcher, T.; Heuschmann, P.U.; Tatlisumak, T.; Tanislav, C.; et al. Acute cerebrovascular disease in the young: The Stroke in Young Fabry Patients study. *Stroke* **2013**, *44*, 340–349. [[CrossRef](#)]
31. Talbot, A.; Nicholls, K. Elevated Lyso-Gb3 Suggests the R118C GLA Mutation Is a Pathological Fabry Variant. *JIMD Rep.* **2019**, *45*, 95–98. [[CrossRef](#)]
32. Eng, C.M.; Ashley, G.A.; Burgert, T.S.; Enriquez, A.L.; D'Souza, M.; Desnick, R.J. Fabry disease: Thirty-five mutations in the alpha-galactosidase A gene in patients with classic and variant phenotypes. *Mol. Med.* **1997**, *3*, 174–182. [[CrossRef](#)]
33. Spada, M.; Marongiu, A.; Voglino, G.; Merlino, S.; Alluto, A.; La Dolcetta, M.; Pagliardini, S. Molecular Study in 20 unrelated male Patients with Fabry Disease: The A143T genotype correlates with the late-onset end-stage nephropathy (abstract). *J. Inher. Metab. Dis.* **2003**, *26*, 1–228. [[CrossRef](#)]
34. Nance, C.S.; Klein, C.J.; Banikazemi, M.; Dikman, S.H.; Phelps, R.G.; McArthur, J.C.; Rodriguez, M.; Desnick, R.J. Later-Onset Fabry Disease: An adult variant presenting with the cramp-fasciculation syndrome. *Arch. Neurol.* **2006**, *63*, 453–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Shabbeer, J.; Yasuda, M.; Benson, S.D.; Desnick, R.J. Fabry disease: Identification of 50 novel alpha-galactosidase A mutations causing the classic phenotype and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Hum. Genom.* **2006**, *2*, 297–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Monserrat, L.; Gimeno-Blanes, J.R.; Marin, F.; Hermida-Prieto, M.; Garcia-Honrubia, A.; Pérez, I.; Fernández, X.; de Nicolas, R.; de la Morena, G.; Payá, E.; et al. Prevalence of Fabry Disease in a Cohort of 508 Unrelated Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2007**, *50*, 2399–2403. [[CrossRef](#)]
37. Lin, H.Y.; Chong, K.W.; Hsu, J.H.; Yu, H.C.; Shih, C.C.; Huang, C.H.; Lin, S.J.; Chen, C.H.; Chiang, C.C.; Ho, H.J.; et al. High Incidence of the Cardiac Variant of Fabry Disease Revealed by Newborn Screening in the Taiwan Chinese Population. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2009**, *2*, 450–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Corry, A.; Feighery, C.; Alderdice, D.; Stewart, F.; Walsh, M.; Dolan, O.M. A family with Fabry disease diagnosed by a single angiokeratoma. *Dermatol. Online J.* **2011**, *17*, 5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Wozniak, M.A.; Kittner, S.J.; Tuhim, S.; Cole, J.W.; Stern, B.; Dobbins, M.; Grace, M.E.; Nazarenko, I.; Dobrovolsky, R.; McDade, E.; et al. Frequency of Unrecognized Fabry Disease Among Young European-American and African-American Men with First Ischemic Stroke. *Stroke* **2010**, *41*, 78–81. [[CrossRef](#)]
40. Smid, B.E.; Hollak, C.E.; Poorthuis, B.J.; van den Bergh Weerman, M.A.; Florquin, S.; Kok, W.E.; Lekanne Deprez, R.H.; Timmermans, J.; Linthorst, G.E. Diagnostic dilemmas in Fabry disease: A case series study on GLA mutations of unknown clinical significance. *Clin. Genet.* **2015**, *88*, 161–166. [[CrossRef](#)]
41. De Brabander, L.; Yperzele, L.; Ceuterick-De Groot, C.; Brouns, R.; Baker, R.; Belachew, S.; Delbecq, J.; De Keulenaer, G.; Dethy, S.; Eyskens, F.; et al. Phenotypical characterization of α -galactosidase A gene mutations identified in a large Fabry disease screening program in stroke in the young. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2013**, *115*, 1088–1093. [[CrossRef](#)]
42. Hauth, L.; Kerstens, J.; Yperzele, L.; Eyskens, F.; Parizel, P.M.; Willekens, B. Galactosidase Alpha p.A143T Variant Fabry Disease May Result in a Phenotype With Multifocal Microvascular Cerebral Involvement at a Young Age. *Front. Neurol.* **2018**, *9*, 336. [[CrossRef](#)]
43. Lenders, M.; Weidemann, F.; Kurschat, C.; Canaan-Kühl, S.; Duning, T.; Stypmann, J.; Schmitz, B.; Reiermann, S.; Krämer, J.; Blaschke, D.; et al. Alpha-Galactosidase A p.A143T, a non-Fabry disease-causing variant. *Orphanet J. Rare Dis.* **2016**, *11*, 54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Eng, C.M.; Resnick-Silverman, L.A.; Niehaus, D.J.; Astrin, K.H.; Desnick, R.J. Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease. *Am. J. Hum. Genet.* **1993**, *53*, 1186–1197. [[PubMed](#)]
45. Guffon, N.; Froissart, R.; Chevalier-Porst, E.; Maire, I. Mutation analysis in 11 French patients with Fabry disease. *Hum. Mutat.* **1998**, *11*, S288–S290. [[CrossRef](#)]
46. Yasuda, M.; Shabbeer, J.; Benson, S.D.; Maire, I.; Burnett, R.M.; Desnick, R.J. Fabry disease: Characterization of alpha-galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele. *Hum. Mutat.* **2003**, *22*, 486–492. [[CrossRef](#)]
47. Oder, D.; Üçeyler, N.; Liu, D.; Hu, K.; Petritsch, B.; Sommer, C.; Ertl, G.; Wanner, C.; Nordbeck, P. Organ manifestations and long-term outcome of Fabry disease in patients with the GLA haplotype D313Y. *BMJ Open* **2016**, *6*, e010422. [[CrossRef](#)]
48. Niemann, M.; Rolfs, A.; Giese, A.; Mascher, H.; Breunig, F.; Ertl, G.; Wanner, C.; Weidemann, F. Lyso-Gb3 Indicates that the Alpha-Galactosidase A Mutation D313Y is not Clinically Relevant for Fabry Disease. *JIMD Rep.* **2013**, *7*, 99–102. [[CrossRef](#)]

49. Hasholt, L.; Ballegaard, M.; Bundgaard, H.; Christiansen, M.; Law, I.; Lund, A.M.; Norremolle, A.; Krogh Rasmussen, A.; Ravn, K.; Turner, Z.; et al. The D313Y variant in the GLA gene—No evidence of a pathogenic role in Fabry disease. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **2017**, *77*, 617–621. [[CrossRef](#)]
50. Hadjivassiliou, M.; Grünewald, R.A.; Kandler, R.H.; Chattopadhyay, A.K.; Jarratt, J.A.; Sanders, D.S.; Sharrack, B.; Wharton, S.B.; Davies-Jones, G.A. Neuropathy associated with gluten sensitivity. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2006**, *77*, 1262–1266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Muehlbacher, M.; Tripal, P.; Roas, F.; Kornhuber, J. Identification of Drugs Inducing Phospholipidosis by Novel in vitro Data. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1925–1934. [[CrossRef](#)]
52. Grassi, S.; Chiricozzi, E.; Mauri, L.; Sonnino, S.; Prinetti, A. Sphingolipids and neuronal degeneration in lysosomal storage disorders. *J. Neurochem.* **2019**, *148*, 600–611. [[CrossRef](#)]
53. Askari, H.; Kaneski, C.R.; Semino-Mora, C.; Desai, P.; Ang, A.; Kleiner, D.E.; Perlee, L.T.; Quezado, M.; Spollen, L.E.; Wustman, B.A.; et al. Cellular and tissue localization of globotriaosylceramide in Fabry disease. *Virchows Archiv* **2007**, *451*, 823–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zotter, A.; Bäuerle, F.; Dey, D.; Kiss, V.; Schreiber, G. Quantifying enzyme activity in living cells. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 15838–15848. [[CrossRef](#)]
55. Koulousios, K.; Stylianou, K.; Pateinakis, P.; Zamanakou, M.; Loules, G.; Manou, E.; Kyriklidou, P.; Katsinas, C.; Ouzouri, A.; Kyriazis, J.; et al. Fabry disease due to D313Y and novel GLA mutations. *BMJ Open* **2017**, *7*, e017098. [[CrossRef](#)]
56. Chew, E.; Ghosh, M.; McCulloch, C. Amiodarone-induced cornea verticillata. *Can. J. Ophthalmol.* **1982**, *17*, 96–99. [[PubMed](#)]
57. Raizman, M.B.; Hamrah, P.; Holland, E.J.; Kim, T.; Mah, F.S.; Rapuano, C.J.; Ulrich, R.G. Drug-induced corneal epithelial changes. *Surv. Ophthalmol.* **2017**, *62*, 286–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Van Der Tol, L.; Cassiman, D.; Houge, G.; Janssen, M.C.; Lachmann, R.H.; Linthorst, G.E.; Ramaswami, U.; Sommer, C.; Tendel, C.; West, M.L.; et al. Uncertain Diagnosis of Fabry Disease in Patients with Neuropathic Pain, Angiokeratoma or Cornea Verticillata: Consensus on the Approach to Diagnosis and Follow-Up. *JIMD Rep.* **2014**, *17*, 83–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Cerebrovascular Phenotype in Fabry Disease Patients Assessed by Ultrasound

Petra Reková, MD , Gabriela Dostalova, MD, PhD, Daniel Rob, MD, PhD, Manuela Vaneckova, MD, PhD, Martina Pavlicova, MS, PhD, Ales Linhart, MD, DrSc, FECS, David Kenlink, MD, PhD 

Received December 15, 2022, from the Department of Neurology and Center of Clinical Neuroscience, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic (P.R., D.K.); Second Department of Internal—Cardiovascular Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic (G.D., D.R., A.L.); Department of Radiology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic (M.V.); and Department of Biostatistics, Mailman School of Public Health, Columbia University Irving Medical Center, New York, New York, USA (M.P.). Manuscript accepted for publication April 25, 2023.

We thank Jan Brilková for helping coordinate the investigation of control patients. We thank all controls for participating in the study. The project was partially supported by the project National Institute for Neurological Research (Programme EXCELIS, ID Project No. LX22NPO5107) is funded by the European Union—Next Generation EU; Charles University: Cooperation Program in Neuroscience; General University Hospital in Prague project MH CZ-DRO-VFN64165.

P.R. has received speaker fees, Takada travel support, and Amicus Therapeutics symposium reimbursement. G.D. has received honoraria and fees for consulting from Amicus Therapeutics, Sanofi Genzyme, and Takada. D.R. has received honoraria and fees for consulting from Sanofi Genzyme. A.L. is a member of the Fabry Registry Board. He has received honoraria and fees for consulting from Amicus Therapeutics, Sanofi, and Takada. M.V., and M.P. state they have no competing interests to declare.

Address correspondence to P. Reková, Department of Neurology and Center of Clinical Neuroscience, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague, Czech Republic.

E-mail: petra.rekova@vfn.cz

Abbreviations

BHI, breath-holding index; BMI, body mass index; BP, blood pressure; CCA, common carotid artery; cIMT, common carotid artery intima-media thickness; CVR, cerebral vasoreactivity; dVA, vertebral artery diameter; EF, ejection fraction; FD, Fabry disease; MCA, middle cerebral artery; PI, pulsatility index; PIn, apnea pulsatility index; TCCS, transcranial color-coded duplex sonography; Vm, mean velocity; Vma, apnea mean blood flow velocity; Vmb, resting mean peak blood flow velocity

doi:10.1002/jum.16254

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

Objectives—Fabry disease (FD) is a rare X-linked lysosomal storage disorder with variable phenotypes, including neurological symptoms. These can be influenced by vascular impairment. Extracranial and transcranial vascular sonography is an effective and noninvasive method for measuring arterial structures and blood flow.

The study aims to investigate cerebrovascular phenotype characteristics in FD patients compared to controls using neurosonology.

Methods—This is a single-center, cross-sectional study of 130 subjects—65 patients (38 females), with genetically confirmed FD, and 65 sex- and age-matched controls. Using ultrasonography, we measured structural and hemodynamic parameters, including distal common carotid artery intima-media thickness, inner vertebral artery diameter, resting blood flow velocity, pulsatility index, and cerebral vasoreactivity (CVR) in the middle cerebral artery. To assess differences between FD and controls and to identify factors influencing investigated outcomes, unadjusted and adjusted regression analyses were performed.

Results—In comparison to sex- and age-matched controls, FD patients displayed significantly increased carotid artery intima-media thickness (observed FD 0.69 ± 0.13 mm versus controls 0.63 ± 0.12 mm; $P_{\text{adj}} = .0014$), vertebral artery diameter (observed FD 3.59 ± 0.35 mm versus controls 3.38 ± 0.33 mm; $P_{\text{adj}} = .0002$), middle cerebral artery pulsatility index (observed FD 0.98 ± 0.19 versus controls 0.87 ± 0.11 ; $P_{\text{adj}} < .0001$), and significantly decreased CVR (observed FD 1.21 ± 0.49 versus controls 1.35 ± 0.38 ; $P_{\text{adj}} = .0409$), when adjusted by age, BMI, and sex. Additionally, FD patients had significantly more variable CVR (0.48 ± 0.25 versus 0.21 ± 0.14 ; $P_{\text{adj}} < .0001$).

Conclusions—Our results suggest the presence of multiple vascular abnormalities and changes in hemodynamic parameters of cerebral arteries in patients with FD.

Key Words—breath-holding index; cerebral blood flow; cerebral vasoreactivity; Fabry disease; intima-media thickness; pulsatility index

Introduction

Fabry disease (FD; OMIM 301500) is a rare X-linked monogenic disorder. Pathogenic variants of the GLA gene result in a dysfunction of the lysosomal enzyme alpha-galactosidase A (-Gal A; EC 3.2.1.22).^{1,2} Lysosomal -Gal A deficiency leads to a disruption of the part of glycosphingolipids catabolic pathway with the subsequent widespread substrate

(mainly globotriaosylceramide, Gb3)³ accumulation, including endothelium and vascular smooth muscle cells.² Accumulation-related changes and other enzymopathy-connected pathophysiological consequences ultimately lead, under the influence of modifying factors, to the clinical manifestation of the disease. Fabry phenotypes range from late-onset manifestations, usually limited to one organ, to severe multiorgan involvement, usually starting from childhood. Hemizygous males are typically more severely affected than heterozygous females.

Besides heart and kidney involvement, the most severe manifestation of FD includes early strokes, which in some cases may be the first clinical manifestation of the disease.^{4,5} The mechanisms underlying stroke pathophysiology in FD are not fully elucidated. Structural and functional damage to the vascular system^{6–9} plays an important role in the FD phenotype, possibly resulting in strokes.

Ultrasound is a well-established, noninvasive method used for structural imaging and blood flow parameters evaluation of the extracranial segment of carotid arteries. Transcranial color-coded duplex sonography (TCCS) is commonly used to analyze intracranial vessels.¹⁰ TCCS breath-holding index (BHI) measurement permits cerebral vasoreactivity (CVR) evaluation in a noninvasive manner. Its impairment was observed in several brain diseases, including stroke,^{11,12} cognitive impairment,^{13–16} and migraine.^{17–19} Although ultrasound is a readily available and commonly used method that allows comprehensive assessment of structural and hemodynamic vascular changes, the literature on global cerebrovascular evaluation in patients with FD is scarce.

Our study aims to explore and describe ultrasound-evaluated brain vascular phenotype in FD patients and compare it with controls.

Materials and Methods

Participants

A total of 154 subjects participated in the study. Of these, 130 were included in the final analysis (Figure 1). Recruitment of participants began in May 2018 and was completed in October 2022.

The evaluation of FD patients was a part of a more extensive systematic diagnostic program of the National

Referral Center for FD, which also included echocardiography, and its detailed procedures were reported previously.²⁰ Sixty-five FD adult patients (38 females, mean age 47.24, range 20–73; 27 males, mean age 47.56, range 20–70) with genetically confirmed pathogenic GLA variant were consecutively included in the study during their regular follow-up to assess the presence and severity of neurological manifestations of the disease.

Sixty-five subjects without FD (mean age 47.37 years, range 20–73 years) were recruited based on their age and sex from the registry of volunteers of our Center of Clinical Neuroscience. The controls were supposed to match the cases on age (within 2 years range of FD patients) and sex. The data were analyzed as independent samples. Subjects with a history of central nervous system disease were not included, but a history of migraine was considered eligible.

The exclusion criteria for participation in the study (with or without FD) were an insufficient acoustic temporal bone window (bilateral presence of sufficient temporal bone windows was required for cohort enrollment), the inability to hold breath without using a Valsalva maneuver, unwillingness to undergo the apnea test repeatedly, and medical history of the carotid or the middle cerebral artery (MCA) stenosis (more than 50%).

Protocol Approvals and Patient Consent

The study was conducted in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Helsinki Declaration of 1974, as revised in 2013). Informed written consent was obtained from all participants, including the agreement with diagnostic procedures and analysis of anonymized clinical data for scientific purposes. The Ethics Committee of the General Faculty Hospital and First Medical Faculty, Charles University, Prague, approved the research.

Clinical Examinations

All participants underwent a thorough neurological examination. We measured their height and weight, calculated body mass index (BMI), measured blood pressure (BP), and heart rate (at rest in the supine position after the extracranial sonographic examination). A detailed medical history was recorded, with particular attention to comorbidities and vascular risk factors—arterial hypertension, diabetes mellitus, dyslipidemia, coronary artery disease, atrial fibrillation,

ischemic stroke, transient ischemic attack, and current smoking.

Neurosonology

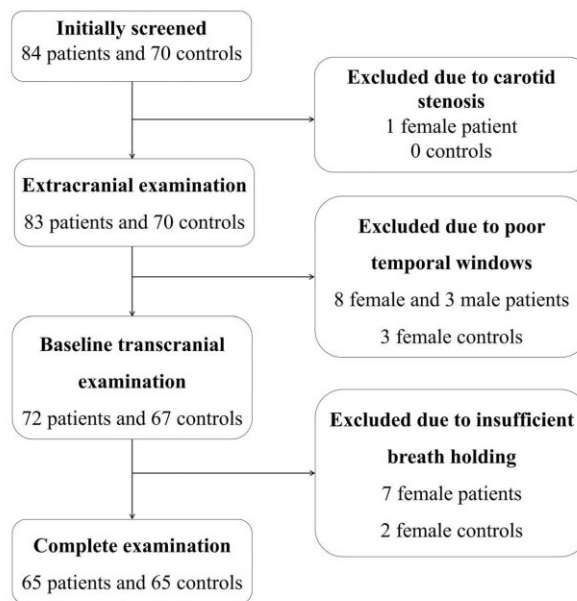
To avoid interoperator variability, all ultrasound examinations were performed by a single experienced neurologist (P.R.) certified in neurosonology by the Czech Neurological Society. Toshiba Aplio 300 ultrasound machine was used. Assessments were performed in the same, quiet, temperature-controlled room (22–24°C) at a similar daytime (between 09:00 and 12:00 AM) under natural daylight conditions but out of direct sunlight.

Extracranial Arteries Examination: Common Carotid Artery Intima-Media Thickness and Vertebral Artery Diameter Measurements

Guidelines of the Czech Neurosonological Society for evaluation of the neck arteries and transcranial sonography were followed.²¹ Our procedure of common carotid artery intima-media thickness (cIMT) measurement (Figure 2) was based on the guidelines of

the Mannheim intima-media thickness consensus.²² Two measurements of the cIMT on both sides were performed from a lateral approach within the approximately 10 mm plaque-free segment in the far wall of the common carotid artery (CCA) 1–2 cm proximal to carotid bifurcation using automated software (AutoIMT, Toshiba Medical System; the AutoIMT provides 80 or 70 measurements per 5 mm at a depth of 3.5 or 4 cm, respectively). The mean cIMT values of each measurement were documented. Measurements were performed twice on both the left and right CCA. The first cIMT measurement was conducted at the end of the CCA examination. After assessing the bifurcation and proximal segments of the internal and external carotid arteries, we returned to the distal CCA and performed the second cIMT measurement. We recorded all images on which we assessed cIMT as loops containing at least three cardiac cycles. Of these, “frozen” diastolic (as measured in B mode by identifying the minimal diameter during the cardiac cycle, after visualization of blood flow and

Figure 1. Flow chart of patients’ selection process.



detection of diastole using color Doppler) images of the vessels were used to measure cIMT. The average value from all four measurements was selected for the subsequent statistical processing.

Vertebral artery diameter was measured manually, in B-mode, in the mid-cervical segment (V2) between the fourth and fifth or fifth and sixth cervical transverse vertebral processes of both sides in diastole (established by color Doppler measurement). We recorded the inner vertebral artery diameter (Figure 3).

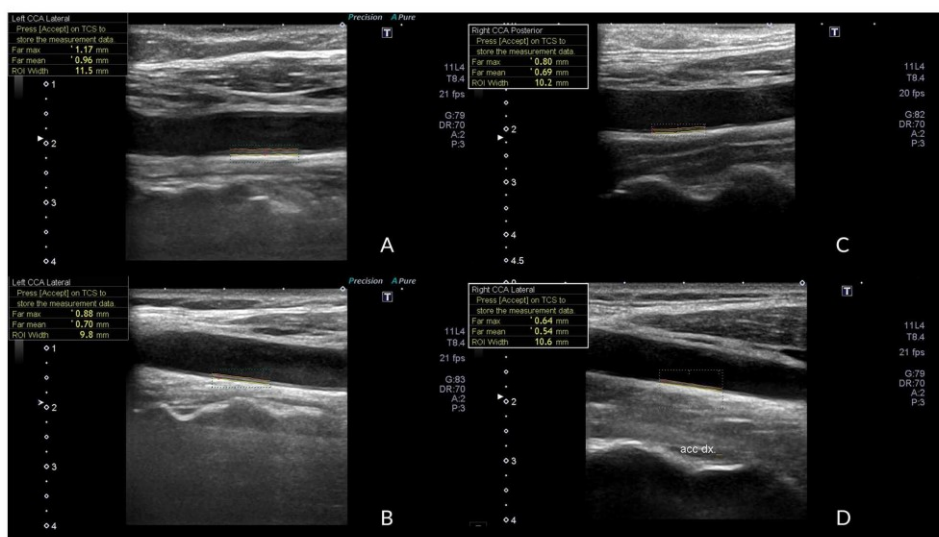
During the selection process to rule out carotid stenosis, we recorded blood flow parameters (pulsatility index [PI] and mean velocity [Vm]) from CCA and internal carotid artery (ICA; CCA-PI, CCA-Vm, ICA-PI, and ICA-Vm). These parameters were additionally included in the analysis.

Transcranial Doppler Assessment

A 2-MHz probe was used for all TCCS examinations. Subjects were laying in a supine position without any

head elevation with upper limbs along the body and uncrossed. Investigated parameters from the middle cerebral artery were obtained via temporal windows at the 48–58 mm depth. We recorded resting mean peak blood flow velocity (Vmb) and PI in MCA. Both parameters were calculated automatically by using automated waveform tracking (Figure 4). Vmb as a time-averaged maximal (peak) velocity and PI as the difference between peak systolic and the lowest diastolic flow velocities referenced to time-averaged flow velocity over one cardiac cycle.²³ Then, following normal inspiration to exclude the Valsalva maneuver, subjects were asked to hold their breath for as long as they could, but for a maximum of 30 seconds. Immediately after apnea, MCA mean blood flow velocity (apnea mean blood flow velocity [Vma]) and PI (apnea pulsatility index [PIa]) were recorded. The apnea duration (in seconds) was documented. BHI was calculated by $(Vma - Vmb)/(Vmb \times \text{breath-holding time}) \times 100$. A total of four records were taken in a stepwise manner—the first two on the left and the next two on the right. There was a pause of

Figure 2. Measurement of distal common carotid intima-media thickness in 73-year-old Fabry disease female (A), 73-year-old female control (B), 35-year-old Fabry disease male (C), and 35-year-old male control (D). Longitudinal sonogram of the distal common carotid artery, B-mode.



at least 3 minutes between each measurement. The averages of Vmb, PI, and BHI measurements on both sides were considered for the analysis. To describe differential variability in BHI measurements between repeated measurements, BHIvar was computed as the sample standard deviation of BHI measurements on both sides together.

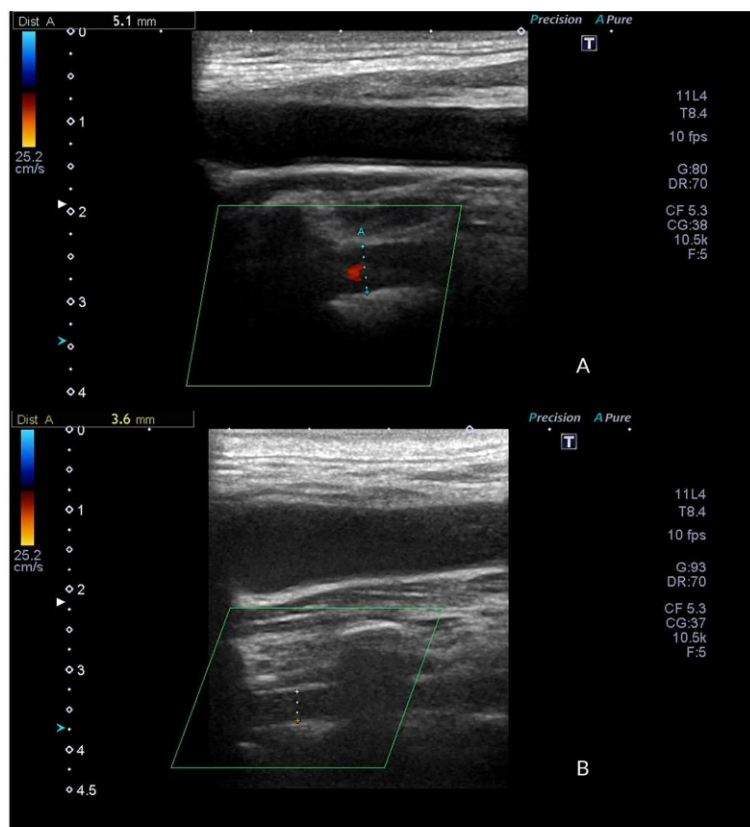
Statistical Analysis

The demographic and clinical characteristics were computed for FD patients and controls overall and

split by sex. The differences between FD patients and controls were assessed using a 2-sample *t* test with the assumption of equal variances (for continuous variables) and a 2-sample proportion *z* test (for binary variables). Additionally, when assessing binary variables, the nonparametric Fisher exact test was used if the expected proportion for at least one cell fell below 5.

The differences between Fabry patients and controls in neurosonological outcomes (cIMT, vertebral artery diameter [dVA], Vmb, BHI, BHIvar, PI, CCA-

Figure 3. Vertebral artery diameter in a 46-year-old Fabry disease male (A) and 47-year-old male control (B). Longitudinal view of the vertebral artery between vertebral processes of the spine, color-coded sonogram (diastole).

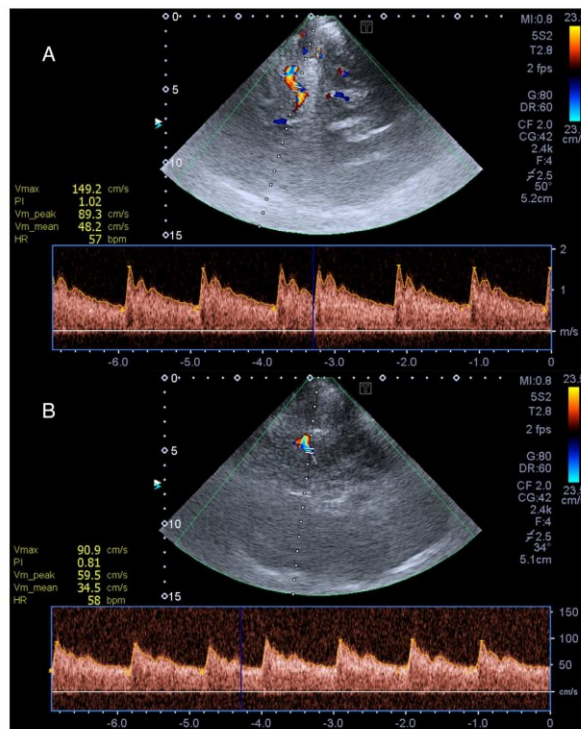


PI, CCA-Vm, ICA-PI, and ICA-Vm) were analyzed using linear regression models. Because FD is believed to be a reason for changes in the neurosonological outcomes, Fabry status was modeled as a predictor in all the models. All outcomes had approximately Gaussian distributions. In the first step, simple regression models for each outcome that included only the binary predictor FD (FD versus control) were applied to all subjects and separately for each gender. In the second step, multivariable regression models assessed the effect of FD status on each outcome, adjusted by additional covariates: continuous age, BMI, and binary sex. The multivariable models were not adjusted by the effect

of active smoking, the occurrence of diabetes mellitus, hypertension, and dyslipidemia because there were not enough cases or controls having those factors. Covariates with highly unbalanced distributions, or those that did not occur frequently, would make the statistical models unstable and could not be included.

Finally, to explore the effect of sex (or age) on differences in neurosonological outcomes between FD and controls, we ran separate multivariable regression models that included either two-way interactions between sex or age, and binary predictor FD (FD versus Control), their corresponding main effects, while adjusted by age or sex, and BMI. If the interaction term's *P*-value was significant or near

Figure 4. Transcranial color-coded duplex image. Transtemporal insonation. Visualization of the left middle cerebral artery and angle-corrected measurement of flow velocity. Spectral waveform at a depth of 51 mm in a 30-year-old Fabry disease male (A) and at a depth of 52 mm in a 30-year-old male control (B).



significant, the gender- or age-specific effects on the association between FD and neurosonological outcomes were described.

Because of the exploratory nature of this paper, *P*-values smaller than 5% were considered significant. All analyses were performed in Stata/BE 17.0.²⁴

Results

Study Population

Demographic and clinical characteristics of 65 FD patients and sex and age-matched 65 controls, overall and split by sex, are depicted in Table 1. One male patient had a reduced ejection fraction (EF) below 40% (35%), and all other analyzed patients had preserved EF \geq 50%.

Vascular Parameters

Means and standard deviations of vascular parameters (cIMT, dVA, Vmb, BHI, BHIvar, PI, CCA-PI, CCA-Vm, ICA-PI, and ICA-Vm) of blood-supplying vessels averaged across the left and right neck side/brain hemisphere are listed in Table 2, overall and for each sex. Additionally, Table 2 displays the results of simple and multivariable linear regressions assessing the effect of FD status on vascular parameters, either unadjusted or adjusted by covariates. Figure 5 shows observed outcomes by age, split by FD status and sex.

Morphologic Changes in Extracranial Brain Feeding Vascular Parameters (cIMT and dVA)

Common Carotid Artery Intima-Media Thickness

There was a significant difference between FD and control patients, unadjusted and when adjusted by covariates. FD patients had, on average, 0.06 mm larger thickness of cIMT compared to controls when adjusted by age, BMI, and sex. In the same adjusted model, age was significantly associated with cIMT, suggesting that with 1 year of age, the thickness of cIMT increases by 0.005 mm on average. For relevant statistics, see Table 2.

There was no significant interaction between sex and FD on cIMT ($T_{118} = -0.88$, $P = .3819$) or between age and FD on cIMT ($T_{118} = -0.23$, $P = .8167$) (Figure 5A).

Vertebral Artery Diameter

FD patients had significantly larger dVA diameter by 0.21 mm compared to controls, on average, in the unadjusted model. Specifically, male FD patients had, on average, 0.27 mm larger dVA, and female FD patients had, on average, 0.18 mm larger dVA compared to controls. Adjusting for covariates, the difference in dVA between FD patients and controls remained significant ($b = 0.22$ mm). For relevant statistics, see Table 2.

There was no significant interaction between sex and FD on dVA ($T_{121} = 0.76$, $P = .4459$) or between age and FD on dVA ($T_{121} = 0.02$, $P = .9851$) (Figure 5B).

Hemodynamic Intracranial Changes in the MCA (Vmb, PI, and BHI)

Resting Mean Peak Blood Flow Velocity

In unadjusted analyses, there were no significant differences in cerebral blood flow velocities based on FD status for all patients, nor when split by sex. However, when adjusted by age, BMI, and sex, the effect of FD status on Vmb reached borderline significance, suggesting that FD patients have, on average, 4.03 cm/second lower blood flow velocity compared to controls. Additionally, based on the adjusted analysis, for 1 year of age, the blood flow velocity significantly decreases by 0.61 cm/second, and males have by 8.92 cm/second lower Vmb compared to females, on average. For relevant statistics, see Table 2.

There was no significant interaction between sex and FD on Vmb ($T_{124} = 0.36$, $P = .7162$). However, there was a trend-level significant interaction between age and FD on Vmb ($T_{124} = -1.79$, $P = .0756$). Among FD patients, aging 1 year was significantly associated with a 0.76 cm/second decrease in Vmb ($T_{61} = -5.70$, $P < .0001$), while among controls, aging 1 year was significantly associated with 0.46 cm/second decrease in Vmb ($T_{61} = -4.65$, $P < .0001$), on average (Figure 5C).

Breath Holding Index and Breath Holding Index Variability

In unadjusted analyses, there were no significant differences in BHI based on FD status for all patients, nor when split by sex. However, when adjusted by age, BMI, and sex, FD patients had significantly lower

Table 1. Baseline Demographic and Clinical Characteristics

	Fabry Disease, Mean (SD) or n (%)				Controls, Mean (SD) or n (%)				Case-Control Comparisons, Test Statistic, P-Value					
	Males		Females		Males		Females		Among All		Among Males		Among Females	
	All (n = 65)	(n = 27)	(n = 38)	All (n = 65)	(n = 27)	(n = 38)	All (n = 65)	(n = 27)	(n = 38)	T_{28}	T_{52}	T_{74}	T_{51}	
Age (years)	47.37 (12.75)	47.56 (12.02)	47.24 (13.40)	47.62 (12.65)	47.78 (12.00)	47.50 (13.25)	47.38 = 0.11, .9122	T_{28} = 0.07, .9461	T_{52} = 0.09, .9316	T_{74} = 0.09, .9316				
Height (cm)	169.85 (9.63)	178.41 (5.95)	163.76 (6.63)	173.95 (7.74)	179.81 (5.97)	169.79 (5.97)	T_{28} = 2.68, .0083	T_{52} = 0.87, .3898	T_{74} = 4.17, .0001					
Weight (kg)	76.46 (15.33)	84.26 (15.96)	70.92 (12.32)	77.55 (14.04)	82.85 (11.37)	73.79 (14.71)	T_{28} = 0.42, .6716	T_{52} = -0.37, .7105	T_{74} = 0.93, .3560					
BMI	26.44 (4.40)	26.42 (4.50)	26.46 (4.39)	25.63 (4.36)	25.67 (3.70)	25.60 (4.82)	T_{28} = -1.06, .2923	T_{52} = -0.67, .5084	T_{74} = -0.81, .4192					
Systolic BP (mm/Hg)	123.4 (17.1)	126.7 (17.7)	121.0 (16.4)	129.8 ^a (16.9)	133.2 ^b (14.0)	127.3 ^c (18.5)	T_{24} = 2.12, .0362	T_{51} = 1.46, .1492	T_{71} = 1.54, .1292					
Diastolic BP (mm/Hg)	80.7 (11.8)	81.6 (12.6)	80.1 (11.3)	83.3 ^d (10.1)	83.8 ^e (10.4)	83.0 ^f (9.8)	T_{24} = 1.35, .1784	T_{51} = 0.68, .4972	T_{71} = 1.18, .2382					
Heart rate (bpm)	66.2 (10.6)	64.6 (11.5)	67.3 (9.9)	66.1 ^g (9.2)	63.3 (8.5)	68.3 ^h (9.3)	T_{26} = -0.04, .9680	T_{50} = -0.45, .6488	T_{71} = 0.42, .6773					
Active smoking	18 (27.7%)	8 (29.6%)	10 (26.3%)	8 (12.3%)	2 (7.4%)	6 (15.8%)	Z = -2.19, .0283	Z = -2.10, .0396	Z = -1.13, .2604					
CKD	18 (27.7%)	12 (44.4%)	6 (15.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	Z = -4.57, <.0001	Z = -3.93, .0001	Z = -3.93, .0001					
DM	4 (6.2%)	4 (14.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	Z = -0.11, .9122	Z = -0.11, .9122	Z = -0.11, .9122					
Hypertension	25 (38.5%)	14 (51.8%)	11 (28.9%)	9 (13.8%)	3 (11.1%)	6 (15.8%)	Z = -3.19, .0014	Z = -3.22, .0013	Z = -3.38, .0007					
Dyslipidemia	28 (43.1%)	14 (51.8%)	14 (36.8%)	7 (10.8%)	5 (18.5%)	2 (5.3%)	Z = -4.15, <.0001	Z = -2.56, .0103	Z = -3.38, .0007					
Stroke/TIA	9 (13.8%)	3 (11.1%)	6 (15.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	Z = -3.65, .0029	Z = -2.35, .0263	Z = -3.38, .0007					
CAD	4 (6.1%)	0 (0%)	4 (10.5%)	1 (1.5%)	1 (3.7%)	0 (0%)	Z = -0.29, .7700	Z = -0.29, .7700	Z = 0.00, 1.0000					
Atrial fibrillation	6 (9.2%)	6 (22.2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	Z = -3.57, .0004	Z = -2.80, .0051	Z = -2.80, .0051					
Migraine	7 (10.8%)	2 (7.4%)	5 (13.2%)	6 (9.2%)	1 (3.7%)	5 (13.2%)	Z = -0.29, .7700	Z = -0.29, .7700	Z = 0.00, 1.0000					
Hyperurcemia	14 (21.5%)	9 (33.3%)	5 (13.2%)	1 (1.5%)	1 (3.7%)	0 (0%)	Z = -3.57, .0004	Z = -2.80, .0051	Z = -2.80, .0051					

Continuous variables were analyzed using two-sample t tests with equal variances, and binary variables were analyzed via a 2-sample proportion z test unless expected values for at least one cell were less than 5. Fisher exact test was used (and noted using superscript). P-values smaller than 5% are bolded. BMI, body mass index; CKD, chronic kidney disease; DM, diabetes mellitus; TIA, transient ischemic attack; CAD, coronary artery disease; SD, standard deviation.

^aFisher exact test.

^bOne observation missing.

^cThree observations missing.

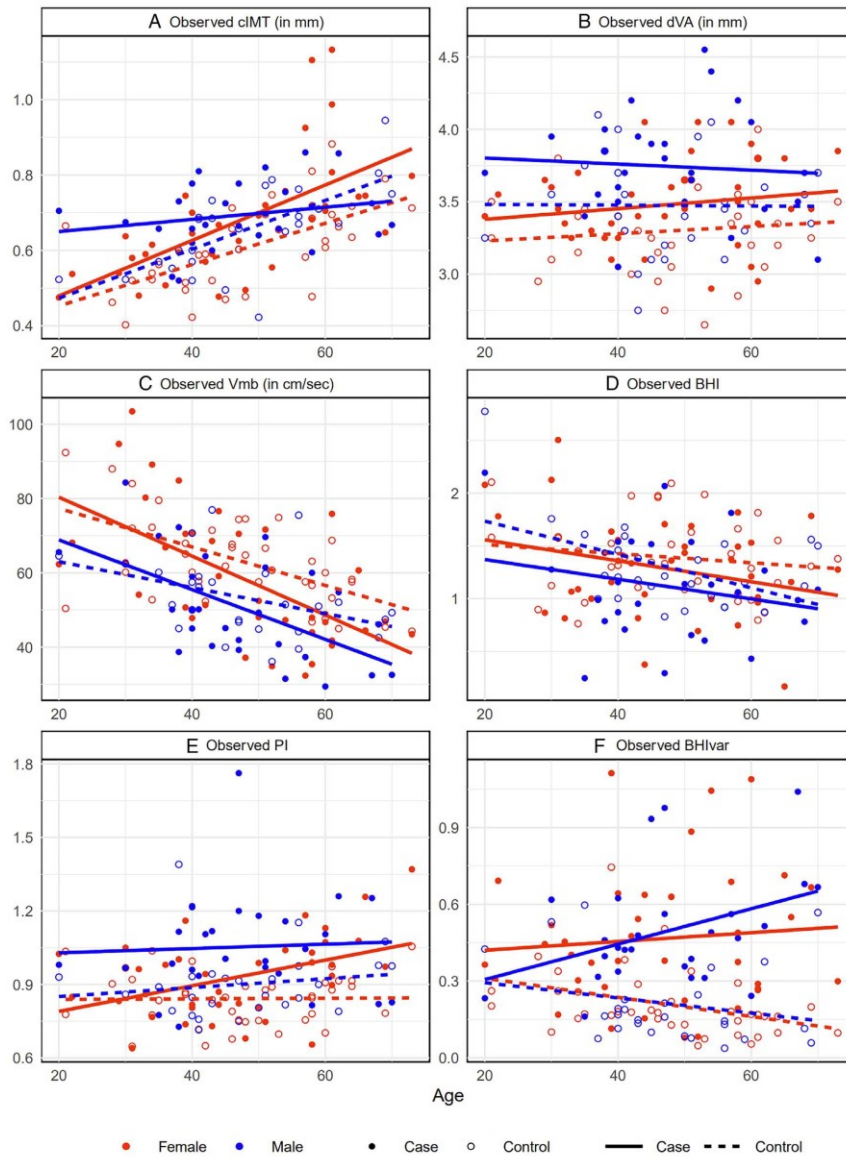
^dFour observations missing.

Table 2. Neurosonological Outcomes in Fabry Disease and Sex- and Age-Matched Controls

	Mean (SD), n				Test Statistic, P-Value				
	Fabry Disease		Controls		Unadjusted Case-Control Comparisons		Adjusted Case-Control Comparisons		Covariates
	All	Males	Females	All	Males	Females	Among All	Among All	
Structural vascular characteristics									
cIMT (mm)	0.69 (0.13), 63	0.69 (0.19), 26	0.68 (0.16), 37	0.63 (0.12), 61	0.65 (0.11), 27	0.61 (0.12), 34	T₁₂ = 2.58, .0111	T₁₉ = 3.27, .0014	Age: T₁₉ = 7.16, <.0001 BMI: T₁₉ = 2.00, .0478 Sex: T₁₉ = 1.73, .0870 Age: T₂₂ = 0.73, .4645 BMI: T₂₂ = -0.38, .7040 Sex: T₂₂ = 3.78, .0002
dVA (mm)	3.59 (0.35), 65	3.74 (0.36), 27	3.48 (0.31), 38	3.38 (0.33), 62	3.47 (0.34), 27	3.30 (0.31), 35	T₂₅ = 3.53, .0006	T₇₁ = 2.53, .0137	Age: T₂₅ = 4.26, <.0001 BMI: T₂₅ = 1.58, .1163 Sex: T₂₅ = 1.79, .0751 Age: T₂₄ = -0.20, .8386 BMI: T₂₄ = -0.83, .4107 Sex: T₂₄ = 0.45, .6562
Hemodynamic intracranial characteristics									
Vmb (cm/second)	55.3 (16.7), 65	50.4 (14.3), 27	58.8 (17.6), 38	59.1 (12.2), 65	53.3 (10.5), 27	63.2 (11.7), 38	T₁₂₈ = -1.47, .1447	T₁₂₈ = -1.95, .0537	Age: T₂₅ = -7.35, <.0001 BMI: T₂₅ = -0.60, .5485 Sex: T₂₅ = -4.26, <.0001
BHI	1.21 (0.49), 65	1.11 (0.49), 27	1.29 (0.47), 38	1.35 (0.38), 65	1.30 (0.40), 27	1.39 (0.37), 38	T₁₂₈ = -1.80, .0736	T₁₂₈ = -2.07, .0409	Age: T₂₅ = 3.37, .0010 BMI: T₂₅ = 1.58, .1163 Sex: T₂₅ = 1.79, .0751
BHVar	0.48 (0.25), 64	0.50 (0.22), 27	0.47 (0.27), 37	0.21 (0.14), 65	0.21 (0.16), 27	0.21 (0.13), 38	T₁₂₇ = 7.56, <.0001	T₁₂₄ = 7.54, <.0001	Age: T₂₄ = 2.20, .0299 BMI: T₂₄ = 1.01, .3166 Sex: T₂₄ = 3.28, .0013
PI	0.98 (0.19), 64	1.06 (0.21), 27	0.93 (0.17), 37	0.87 (0.12), 65	0.90 (0.14), 27	0.84 (0.11), 38	T₁₂₇ = 4.08, .0001	T₁₂₄ = 4.36, <.0001	Age: T₂₄ = 2.20, .0299 BMI: T₂₄ = 1.01, .3166 Sex: T₂₄ = 3.28, .0013
Hemodynamic extracranial characteristics									
CCA-PI	2.14 (0.95), 65	2.54 (0.51), 27	1.85 (0.37), 38	1.94 (0.42), 64	2.44 (0.43), 27	1.80 (0.34), 37	T₁₂₇ = 2.27, .0252	T₁₂₄ = 2.78, .0063	Age: T₂₄ = -3.67, .0004 BMI: T₂₄ = -0.41, .6792 Sex: T₂₄ = 7.29, <.0001
CCA-Vm (cm/second)	33.4 (8.0), 65	28.2 (6.8), 27	37.0 (6.8), 38	36.9 (6.4), 64	34.6 (6.1), 27	38.6 (6.8), 37	T₁₂₇ = -2.78, .0063	T₁₂₄ = -3.28, .0013	Age: T₂₄ = -3.39, .0009 BMI: T₂₄ = -0.07, .9464 Sex: T₂₄ = 5.66, <.0001
ICA-PI	1.07 (0.19), 65	1.15 (0.19), 27	1.01 (0.18), 38	1.01 (0.13), 64	1.05 (0.13), 27	0.98 (0.13), 37	T₁₂₇ = 2.05, .0429	T₁₂₄ = 2.31, .02251	Age: T₂₄ = 3.03, .0030 BMI: T₂₄ = -0.33, .7447 Sex: T₂₄ = 3.79, .0002
ICA-Vm (cm/second)	41.9 (12.9), 65	35.8 (10.3), 27	46.3 (13.0), 38	42.3 (9.4), 64	39.0 (8.2), 27	44.8 (9.5), 37	T₁₂₇ = -0.20, .8387	T₁₂₄ = -0.38, .7030	Age: T₂₄ = 5.50, <.0001 BMI: T₂₄ = -0.01, .9906 Sex: T₂₄ = -4.74, <.0001

Unadjusted case-control comparisons were computed using simple linear regressions for all patients and for each of the sexes. Adjusted case-control comparisons for all patients were computed using multivariable linear regression in which the effect of Fabry disease versus control was adjusted by continuous age and BMI, and binary sex. P-values smaller than 5% are bolded. BHI, breath holding index; BHVar, breath holding index variability; BMI, body mass index; CCA, common carotid artery; cIMT, intima-media thickness in the distal common carotid artery; dVA, vertebral artery diameter; ICA, internal carotid artery; PI, pulsatility index in the middle cerebral artery; SD, standard deviation; Vm, mean blood flow velocity; Vmb, resting mean blood flow velocity in the middle cerebral artery.

Figure 5. Observed neurosonological outcomes by age, split by Fabry status and sex.



BHI scores than controls, by 0.15 points on average. For relevant statistics, see Table 2.

There was no significant interaction between sex and FD on BHI ($T_{121} = -0.49$, $P = .6261$) or between age and FD on BHI ($T_{121} = -0.16$, $P = .8714$).

There was a significant difference in BHIvar between FD patients and controls, with FD patients having a BHIvar of 0.27 greater than controls. Specifically, male FD patients had, on average, 0.29 points larger BHIvar, and female FD patients had, on average, 0.26 points larger BHIvar compared to controls. Adjusting for covariates, the difference in BHIvar between FD patients and controls did not change ($b = 0.27$). For relevant statistics, see Table 2.

There was no significant interaction between sex and FD on BHIvar ($T_{123} = 0.38$, $P = .7046$). However, there was a significant interaction between age and FD on BHIvar ($T_{123} = 2.51$, $P = .0135$). Among FD patients, aging 1 year did not significantly change BHIvar ($b = 0.0041$, $T_{60} = 0.46$, $P = .6493$), while among controls, aging 1 year was significantly associated with 0.0037 decreases in BHIvar ($T_{60} = -2.61$, $P = .0115$), on average (Figure 5, D and F).

Pulsatility Index

In the unadjusted model, FD patients had, on average, significantly higher PI by 0.12 points compared to controls. Specifically, male FD patients had, on average, 0.15 points higher PI, and female FD patients had, on average, 0.09 points higher PI than controls. Adjusting for covariates, the significant difference in PI between FD patients and controls did not change ($b = 0.12$), and additionally, males had, on average, higher PI by 0.09 compared to females. For relevant statistics, see Table 2.

There was no significant interaction between sex and FD on PI ($T_{123} = 1.17$, $P = .2429$) or between age and FD on PI ($T_{123} = 1.35$, $P = .1787$) (Figure 5E).

Hemodynamic Extracranial Changes (CCA and ICA) Common Carotid Artery-Pulsatility Index

There was a significant difference between FD and control patients, unadjusted and when adjusted by covariates. FD patients had, on average, higher CCA-PI by 0.20 points compared to controls when

adjusted by age, BMI, and sex. For relevant statistics, see Table 2.

There was no significant interaction between age and FD on CCA-PI ($T_{123} = 1.65$, $P = .1007$). However, there was a significant interaction between sex and FD on CCA-PI ($T_{123} = 2.55$, $P = .0119$). The effect of FD status on CCA-PI among women was not significant ($b = 0.052$, $T_{75} = 0.66$, $P = .5117$), but among men, FD patients had, on average, significantly higher CCA-PI by 0.40 points ($T_{50} = 3.18$, $P = .0026$), compared to controls.

Common Carotid Artery-Mean Velocity

There was a significant difference between FD and control patients, unadjusted and when adjusted by covariates. FD patients had, on average, significantly lower CCA-Vm by 3.67 cm/second compared to controls when adjusted by age, BMI, and sex. For relevant statistics, see Table 2.

There was no significant interaction between age and FD on CCA-Vm ($T_{123} = -0.34$, $P = .6110$). However, there was a significant interaction between sex and FD on CCA-Vm ($T_{123} = -2.13$, $P = .0349$). Among women, the effect of FD status on CCA-Vm was not significant ($b = -1.64$, $T_{75} = -1.08$, $P = .2818$), but among men, FD patients had significantly lower CCA-Vm by 6.5 cm/second ($T_{50} = -4.04$, $P = .0002$) than controls, on average.

Internal Carotid Artery-Pulsatility Index

There was a significant difference between FD and control patients, unadjusted and when adjusted by covariates. FD patients had, on average, higher ICA-PI by 0.063 points compared to controls when adjusted by age, BMI, and sex. For relevant statistics, see Table 2.

There was no significant interaction between sex and FD on ICA-PI ($T_{123} = 1.24$, $P = .2160$) or between age and FD on ICA-PI ($T_{123} = 0.91$, $P = .3658$).

Internal Carotid Artery-Mean Velocity

There were no significant differences between FD and control patients in unadjusted nor adjusted by covariates models. For relevant statistics, see Table 2.

There was no significant interaction between sex and FD on ICA-Vm ($T_{123} = -1.31$, $P = .1912$) or between age and FD on ICA-Vm ($T_{123} = -1.01$, $P = .3159$).

Discussion

We report a case–control study in patients with FD aiming to evaluate the presence of cerebrovascular abnormalities detectable by ultrasound.

Morphologic Changes in Extracranial Brain Feeding Vessels (cIMT and dVA)

Common Carotid Artery Intima-Media Thickness

Our results show an expected age-dependent cIMT increase in both the FD patients and controls. The association between aging and cIMT increase in the general population is known.²⁵ Our cohort's estimated yearly increase in cIMT (0.005 mm) is similar to published research.²⁵ Additionally, we observed thicker cIMT in FD patients. Based on the literature, FD also contributes to the thickening of cIMT, and an increase of intima-media thickness of large or medium-sized arteries was repeatedly described.^{6,26,27} The pathophysiological role of a nonatherosclerotic, Fabry-specific mechanism was shown,²⁷ although conventional vascular risk factors contributing to atherosclerotic changes may also play a role.²⁸

Vertebral Artery Diameter

Generally, FD patients have enlarged diameter and tortuosity of intracranial arteries, especially in the posterior circulation.^{9,29–31} Similar findings were at the extracranial brain supplying arteries.³² However, to our knowledge, our study is the first that evaluates specific structural changes of the vertebral artery in FD patients. Our data showed similar changes, already documented within the vertebrobasilar segments, also in vertebral arteries. The enlarged diameter of the vertebral artery was observed in both males and females, and it was not significantly different between sexes, which is in disagreement with Manara et al⁹ and Uçeyler et al,³¹ who reported an enlarged diameter of the basilar artery or posterior cerebral arteries only in men using magnetic resonance imaging.

Hemodynamic Changes in the MCA (Vmb, PI, and BHI)

Resting Mean Peak Blood Flow Velocity

In agreement with other case–control published studies, we did not show a significant difference between FD patients and controls in mean blood flow velocities in MCA.^{33–35} The observed MCA Vmb in our

study was slightly higher than in some studies^{33,35} but slightly lower than in others.³⁴ These discrepancies might be partially explained by demographic differences of the FD patients' groups (ie, Fabry-specific treatment, age). Moreover, methodological factors may play a role as well (ie, exclusion of patients with extracranial carotid pathology, sitting versus supine examination position, use of transcranial Doppler instead angle-corrected TCCS).

In agreement with the literature,^{36–38} our study showed a significant decrease in Vmb with age among controls. To our knowledge, this is the first study that relates aging and Vmb in the MCA among FD patients. Specifically, the Vmb decrease with age among FD patients was not only significant but also much faster (almost 70% faster) than among controls.

Although we observed significant differences in CCA-Vm between FD and controls, resting ICA-Vm and Vmb did not differ. This may be related to the autoregulatory capabilities of cerebral blood flow. Studies examining the relationship between resting cerebral blood flow and flow rates in the proximal arterial circulation (ie, CCA blood flow velocity, cardiac output) are sparse. However, the available data support the independence of cerebral blood flow.^{39,40} The faster observed yearly Vmb decline in FD might reflect the depleting capacity of the autoregulatory processes of the intracranial circulation.

Cerebral Vasoreactivity

The ability of brain arteries to respond to hypercapnia, measured by the breath-holding method,⁴¹ is used as a marker of the arterial wall functional integrity. It is mainly linked to the correct function of the endothelium and smooth muscle cells.

When analyzing average BHI values (of all four measurements) unadjusted, we did not demonstrate significantly altered CVR in patients with FD compared to controls. This finding is consistent with the results of other studies (including smaller numbers of patients compared to our cohort),^{8,34,42} which also did not find a significant difference in the CVR of anterior circulatory arteries. However, to our knowledge, our study is the only one that had enough patients to perform analysis adjusted by age, sex, and BMI, in which the CVR was significantly different between FD and controls.

Of note, when repeating the BHI test, we observed nonconstant responses in FD patients. Intraindividual variability was significantly higher in FD patients compared to controls. To explain this phenomenon, more studies are needed. Previously, Moore et al⁸ described regionally prolonged response to acetazolamide (elevated cerebral blood flow) in FD patients. Hypothetically, similar pathophysiological mechanisms might be involved in observed BHI variability as in abnormalities in the study by Moore et al, who observed different vascular recovery responses after acetazolamide in FD patients compared to controls. In the literature, several changes that might contribute to BHI variability have been described at the level of the intima and tunica media or vascular innervation. Endothelial dysfunction is dominant at the intima level, as demonstrated in FD animal models.^{43,44} Moreover, in connection with Gb3 accumulation, decreased expression of K(Ca)_v3.1 channel,⁴⁵ contributing to endothelium-dependent relaxation, was described.⁴⁶ In addition to the Gb3, the accumulation of its deacylated form (globotriaosylsphingosine [lysoGb3]) plays a role. LysoGb3 has been shown to stimulate smooth muscle cell proliferation in vitro.^{47,48} Further, vascular dysfunction may be affected by FD neuropathy, typically affecting thin nerve fibers (including the autonomic nervous system), which disrupts the proper function of vasomotor innervation.

An increase in BP, mediated by sympathetic nervous system activity, contributes to the apnea-induced blood flow velocity change in MCA.⁴⁹ Thus, small fiber neuropathy in FD may play a role through possible abnormal BP regulation post apnea.

Pulsatility Index

PI is defined as the peak-to-peak height of the sonogram waveform divided by the mean velocity recorded throughout the cardiac cycle.²³ Our results show significantly higher PI in FD patients than in controls. Higher PI was observed among males, and PI values increased with age, which is consistent with findings in a larger Czech cohort of non-FD patients.⁵⁰

The finding of a higher PI in patients with FD could indicate vascular involvement. The PI increase is often interpreted as a reflection of downstream arterial tree resistance and is used as a marker of

microangiopathic changes in the distal vascular bed of the measured artery.^{51–53} Another explanation for increased PI may be the loss of large vessels elasticity. As a result of the stiffened vessel's inability to function as a blood reservoir, elastic arteries fail to protect the microcirculation of the target organ from the transmission of harmful pulsations. This may be important in the brain since its normal perfusion is characterized by high flow and low resistance.⁵⁴ Our observation of significantly higher CCA-PI and ICA-PI in male patients may reflect impaired compliance of large arteries. However, the assessment of waveforms for analyzing arterial stiffness from Doppler tracings is not reliable. Differentiating whether increased PI in FD patients is due to microangiopathy or damage to elastic arteries remains to be investigated.

Strengths and Limitations

Strengths of our study include a relatively large sample of patients with FD, considering its rare etiology.

Some limitations may have influenced the study results. First, investigators were not blinded to whether they examined a healthy volunteer or a patient. However, our highly standardized internal protocol for investigating organ manifestation of FD minimizes observer bias, and all ultrasound measurements were performed by one investigator only. Moreover, using TCCS allowed the correction of the angle of insonation, providing a more precise measurement of blood flow velocities.

Further limitations are due to the involvement of patients treated with FD-specific therapy (chaperone or enzyme replacement therapy), which may alter natural vascular disease phenotype. Moreover, the observed unbalanced distribution in the variables that indicated active smoking, the occurrence of diabetes mellitus, hypertension, and dyslipidemia prevented using these variables as covariates in the statistical analyses.

Additionally, since color Doppler was used as part of the dVA (and exceptionally cIMT) measurements, this might have affected the precise identification of the intima-lumen interface due to decreased frame rate when using a color Doppler. However, to minimize inaccuracies and avoid difficulties with color bleed into the wall, we adjusted the parameters of the color Doppler instrument or removed superimposed

color images from acquired pictures to obtain optimal images for dVA measurements for a given subject, if necessary (Figure 3).

Lastly, we did not measure BP continuously during the breath-holding test. Changes in BP during the breath-holding stimulus and their contribution to breath-holding response variability in FD need to be further explored.

Conclusions

We demonstrated multiple differences in neurosonological parameters between FD patients and controls. Observed changes indicate a complex age-dependent vascular impairment among the FD cohort.

We confirmed a more frequent occurrence of vascular wall changes of large arteries (cIMT and dVA) in FD patients. We discovered a substantially higher variability in cerebrovascular reactivity response to the breath-holding test as a possible novel FD-specific phenotype. We showed an increased PI in FD patients, potentially reflecting increased vascular resistance and stiffness of the vascular bed.

We conclude that cerebrovascular impairment in FD is complex but can be measured using neurosonology.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

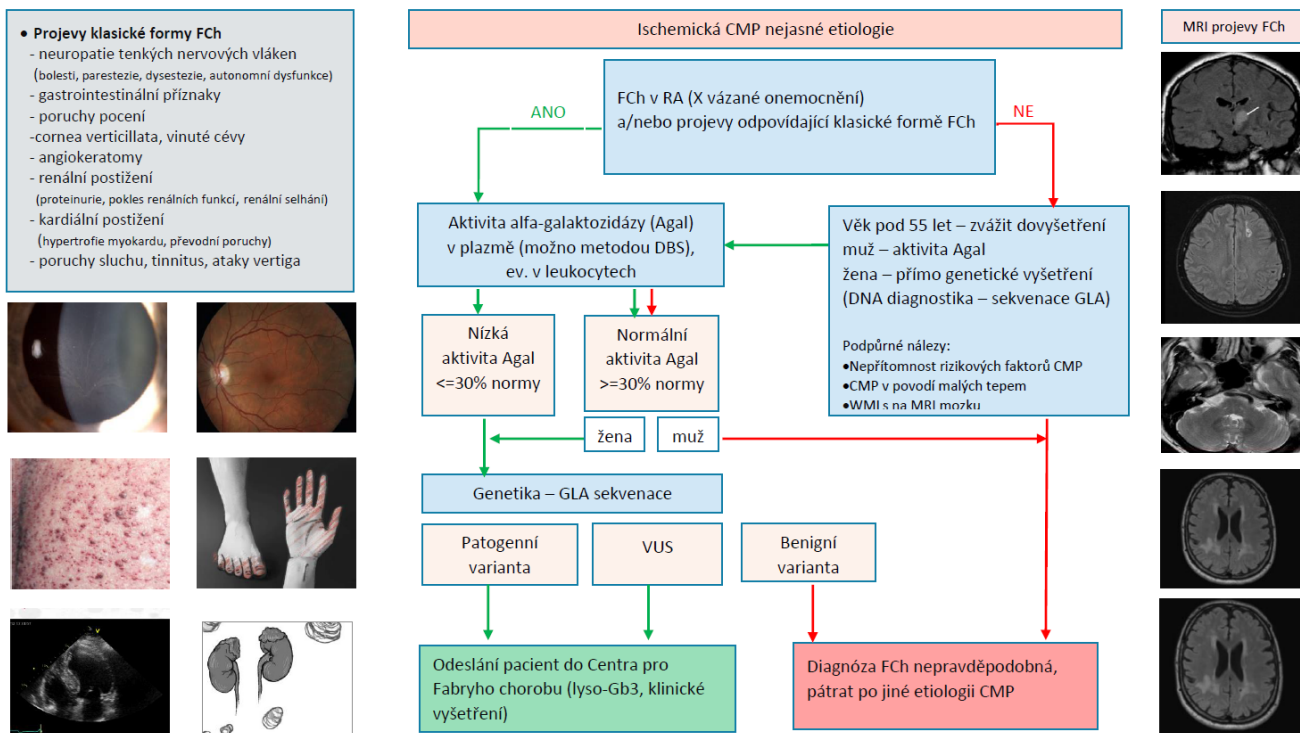
References

1. Brady RO, Gal AE, Bradley RM, Martensson E, Warshaw AL, Laster L. Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency. *N Engl J Med* 1967; 276:1163–1167. <https://doi.org/10.1056/nejm196705252762101>.
2. Germain DP. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5:30. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-30>.
3. Sweeley CC, Klionsky B. Fabry's disease: classification as a sphingolipidosis and partial characterization of a novel glycolipid. *J Biol Chem* 1963; 238:3148–3150.
4. Sims K, Politei J, Banikazemi M, Lee P. Stroke in Fabry disease frequently occurs before diagnosis and in the absence of other clinical events: natural history data from the Fabry Registry. *Stroke* 2009; 40:788–794. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.108.526293>.
5. Tomek A, Reková P, Paulasová Schwabová J, et al. Nationwide screening for Fabry disease in unselected stroke patients. *PLoS One* 2021; 16:e0260601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260601>.
6. Barbey F, Brakch N, Linhart A, et al. Increased carotid intima-media thickness in the absence of atherosclerotic plaques in an adult population with Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* 2006; 95: 63–68. <https://doi.org/10.1080/08035320600618924>.
7. Kalliokoski RJ, Kalliokoski KK, Penttinen M, et al. Structural and functional changes in peripheral vasculature of Fabry patients. *J Inher Metab Dis* 2006; 29:660–666. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0340-x>.
8. Moore DF, Altarescu G, Herscovitch P, Schiffmann R. Enzyme replacement reverses abnormal cerebrovascular responses in Fabry disease. *BMC Neurol* 2002; 2:4. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-2-4>.
9. Manara R, Carlier RY, Righetto S, et al. Basilar artery changes in Fabry disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 2017; 38:531–536. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5069>.
10. Bartels E, Fuchs HH, Flügel KA. Color Doppler imaging of basal cerebral arteries: normal reference values and clinical applications. *Angiology* 1995; 46:877–884. <https://doi.org/10.1177/000331979504601002>.
11. Silvestrini M, Vernieri F, Pasqualetti P, et al. Impaired cerebral vasoreactivity and risk of stroke in patients with asymptomatic carotid artery stenosis. *JAMA* 2000; 283:2122–2127. <https://doi.org/10.1001/jama.283.16.2122>.
12. Markus H, Cullinane M. Severely impaired cerebrovascular reactivity predicts stroke and TIA risk in patients with carotid artery stenosis and occlusion. *Brain* 2001; 124:457–467. <https://doi.org/10.1093/brain/124.3.457>.
13. Shim Y, Yoon B, Shim DS, Kim W, An JY, Yang DW. Cognitive correlates of cerebral vasoreactivity on transcranial Doppler in older adults. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2015; 24:1262–1269. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.01.031>.
14. Tomek A, Urbanová B, Magerová H, et al. Neurosonological markers predicting cognitive deterioration. *Cesk Slov Neurol N* 2017; 80:409–417. <https://doi.org/10.14735/amcsnn201740>.
15. Urbanova BS, Schwabova JP, Magerova H, et al. Reduced cerebrovascular reserve capacity as a biomarker of microangiopathy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis* 2018; 63:465–477. <https://doi.org/10.3233/jad-170815>.
16. Diomedì M, Rocco A, Bonomi CG, et al. Haemodynamic impairment along the Alzheimer's disease continuum. *Eur J Neurol* 2021; 28:2168–2173. <https://doi.org/10.1111/ene.14834>.
17. Silvestrini M, Cupini LM, Troisi E, Matteis M, Bernardi G. Estimation of cerebrovascular reactivity in migraine without aura. *Stroke* 1995; 26:81–83. <https://doi.org/10.1161/01.str.26.1.81>.

18. Fiermonte G, Annulli F, Pierelli F. Transcranial Doppler evaluation of cerebral hemodynamics in migraineurs during prophylactic treatment with flunarizine. *Cephalalgia* 1999; 19:492–496. <https://doi.org/10.1046/j.1468-2982.1999.019005492.x>.
19. Akgün H, Taşdemir S, Üh U, et al. Reduced breath holding index in patients with chronic migraine. *Acta Neurol Belg* 2015; 115:323–327. <https://doi.org/10.1007/s13760-014-0375-y>.
20. Rob D, Marek J, Dostalova G, Linhart A. Heart failure in Fabry disease revisited: application of current heart failure guidelines and recommendations. *ESC Heart Fail* 2022; 9:4043–4052. <https://doi.org/10.1002/ehf2.14091>.
21. Školoudík D, Václavík D. Transkraniální barevná duplexní sonografie—národní standard vyšetřovací metodiky. *Cesk Slov Neurol N* 2002; 1:18–21.
22. Touboul P, Hennerici M, Meairs S, et al. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004–2006–2011). *Cerebrovasc Dis* 2012; 34:290–296.
23. Gosling RG, King DH. Arterial assessment by Doppler-shift ultrasound. *Proc R Soc Med* 1974; 67(6 Pt 1):447–449.
24. StataCorp. *Stata Statistical Software: Release 17*. College Station, TX: StataCorp; 2021.
25. van den Munckhof ICL, Jones H, Hopman MTE, et al. Relation between age and carotid artery intima-medial thickness: a systematic review. *Clin Cardiol* 2018; 41:698–704. <https://doi.org/10.1002/dc.22934>.
26. Boutouyrie P, Laurent S, Laloux B, Lidove O, Grunfeld JP, Germain DP. Arterial remodelling in Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* 2002; 91:62–66. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2002.tb03113.x>.
27. Rombach SM, van den Bogaard B, de Groot E, et al. Vascular aspects of Fabry disease in relation to clinical manifestations and elevations in plasma globotriaosylsphingosine. *Hypertension* 2012; 60:998–1005. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.112.195685>.
28. Roy A, Umar H, Ochoa-Ferraro A, et al. Atherosclerosis in Fabry disease—a contemporary review. *J Clin Med* 2021; 10:4422. <https://doi.org/10.3390/jcm10194422>.
29. Fellgiebel A, Keller I, Marin D, et al. Diagnostic utility of different MRI and MR angiography measures in Fabry disease. *Neurology* 2009; 72:63–68. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000338566.54190.8a>.
30. Fellgiebel A, Keller I, Martus P, et al. Basilar artery diameter is a potential screening tool for Fabry disease in young stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 2011; 31:294–299. <https://doi.org/10.1159/000322558>.
31. Uçeyler N, Homola GA, Guerrero González H, et al. Increased arterial diameters in the posterior cerebral circulation in men with Fabry disease. *PLoS One* 2014; 9:e87054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087054>.
32. Vujkovic AC, Vujkovic B, Novaković S, Števanec M, Šabović M. Characteristics of vascular phenotype in Fabry patients. *Angiology* 2021; 72:426–433. <https://doi.org/10.1177/0003319720981521>.
33. Hilz MJ, Kolodny EH, Brys M, Stemper B, Haendl T, Marthol H. Reduced cerebral blood flow velocity and impaired cerebral autoregulation in patients with Fabry disease. *J Neurol* 2004; 251:564–570. <https://doi.org/10.1007/s00415-004-0364-9>.
34. Segura T, Ayo-Martín O, Gómez-Fernández I, Andrés C, Barba MA, Vivancos J. Cerebral hemodynamics and endothelial function in patients with Fabry disease. *BMC Neurol* 2013; 13:170. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-13-170>.
35. Uçeyler N, He L, Kahn AK, Breunig F, Müllges W, Sommer C. Cerebral blood flow in patients with Fabry disease as measured by Doppler sonography is not different from that in healthy individuals and is unaffected by treatment. *J Ultrasound Med* 2012; 31:463–468. <https://doi.org/10.7863/jum.2012.31.3.463>.
36. Peisker T, Bartoš A, Skoda O, Ibrahim I, Kalvach P. Impact of aging on cerebral vasoregulation and parenchymal integrity. *J Neurol Sci* 2010; 299:112–115. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.08.064>.
37. Bertsch K, Hagemann D, Hermes M, Walter C, Khan R, Naumann E. Resting cerebral blood flow, attention, and aging. *Brain Res* 2009; 1267:77–88. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.053>.
38. Alwatban MR, Aaron SE, Kaufman CS, et al. Effects of age and sex on middle cerebral artery blood velocity and flow pulsatility index across the adult lifespan. *J Appl Physiol* 2021; 130:1675–1683. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00926.2020>.
39. Eicke BM, von Schlichting J, Mohr-Ahaly S, et al. Lack of association between carotid artery volume blood flow and cardiac output. *J Ultrasound Med* 2001; 20:1293–1298. <https://doi.org/10.7863/jum.2001.20.12.1293>.
40. Henriksen OM, Jensen LT, Krabbe K, Larsson HB, Rostrop E. Relationship between cardiac function and resting cerebral blood flow: MRI measurements in healthy elderly subjects. *Clin Physiol Funct Imaging* 2014; 34:471–477. <https://doi.org/10.1111/cpf.12119>.
41. Markus HS, Harrison MJ. Estimation of cerebrovascular reactivity using transcranial Doppler, including the use of breath-holding as the vasodilatory stimulus. *Stroke* 1992; 23:668–673. <https://doi.org/10.1161/01.str.23.5.668>.
42. Castro P, Gutierrez M, Pereira G, Ferreira S, Oliveira JP, Azevedo E. Evaluation of cerebral microvascular regulatory mechanisms with transcranial doppler in Fabry disease. *Brain Sci* 2020; 10:528. <https://doi.org/10.3390/brainsci10080528>.
43. Shu L, Park JL, Byun J, Pennathur S, Kollmeyer J, Shayman JA. Decreased nitric oxide bioavailability in a mouse model of Fabry disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:1975–1985. <https://doi.org/10.1681/asn.2008111190>.

44. Meng XL, Arming E, Wight-Carter M, et al. Priapism in a Fabry disease mouse model is associated with upregulated penile nNOS and eNOS expression. *J Inherit Metab Dis* 2018; 41:231–238. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0107-6>.
45. Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Köhler R. Endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses—relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br J Pharmacol* 2009; 157:509–526. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00132.x>.
46. Park S, Kim JA, Joo KY, et al. Globotriaosylceramide leads to K(Ca)_v3.1 channel dysfunction: a new insight into endothelial dysfunction in Fabry disease. *Cardiovasc Res* 2011; 89:290–299. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq333>.
47. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:2812–2817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712309105>.
48. Barbey F, Brakch N, Linhart A, et al. Cardiac and vascular hypertrophy in Fabry disease: evidence for a new mechanism independent of blood pressure and glycosphingolipid deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:839–844. <https://doi.org/10.1161/01.Atv.0000209649.60409.38>.
49. Przybyłowski T, Bangash MF, Reichmuth K, Morgan BJ, Skatrud JB, Dempsey JA. Mechanisms of the cerebrovascular response to apnoea in humans. *J Physiol* 2003; 548(Pt 1):323–332. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.029678>.
50. Kešnerová P, Školoudík D, Herzig R, Netuka D, Szegedi I, Langová K. Peripheral vascular resistance in cerebral arteries in patients with carotid atherosclerosis—substudy results of the atherosclerotic plaque characteristics associated with a progression rate of the plaque and a risk of stroke in patients with the carotid bifurcation plaque study (ANTIQUÉ). *J Ultrasound Med* 2022; 41:237–246. <https://doi.org/10.1002/jum.15703>.
51. Kidwell CS, el-Saden S, Livshits Z, Martin NA, Glenn TC, Saver JL. Transcranial Doppler pulsatility indices as a measure of diffuse small-vessel disease. *J Neuroimaging* 2001; 11:229–235. <https://doi.org/10.1111/j.1552-6569.2001.tb00039.x>.
52. Mok V, Ding D, Fu J, et al. Transcranial Doppler ultrasound for screening cerebral small vessel disease: a community study. *Stroke* 2012; 43:2791–2793. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.112.665711>.
53. Nam KW, Kwon HM, Lee YS. Distinct association between cerebral arterial pulsatility and subtypes of cerebral small vessel disease. *PLoS One* 2020; 15:e0236049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236049>.
54. Climie RE, Gallo A, Picone DS, et al. Measuring the interaction between the macro- and micro-vasculature. *Front Cardiovasc Med* 2019; 6:169. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00169>.

10.4 Příloha 4



Upraveno podle: European Journal of Heart Failure, Volume: 22, Issue: 7, Pages: 1076-1096, First published: 08 July 2020, DOI: (10.1002/ejhf.1960)
 Zkratky: FCh = Fabryho choroba; CMP = cévní mozková příhoda; RA = rodinná anamnéza; DBS = suchá krevní kapka (dry blood spot); VUS = varianta nejasného významu