

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**Neurologické projevy Fabryho nemoci**

MUDr. Petra Reková

2023

## **Doktorské studijní programy v biomedicíně**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Studijní program: Neurovědy

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

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

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

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

## **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 developing an irreversible organ damage. Identifying vascular abnormalities and the influence of comorbidities on the cerebrovascular phenotype of FD patients may help to promote the 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 thesis we showed a relatively high prevalence of FD in adult patients with acute stroke, proposed to reclassify 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 a 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 a 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

## Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>8</b>
2.1. PRÁCE 1: STANOVENÍ PREVALENCE FABRYHO CHOROBY U NESELEKTOVANÝCH PACIENTŮ S AKUTNÍ CÉVNÍ MOZKOVOU PŘÍHODOU V ČESKÉ REPUBLICCE .....	8
2.2. PRÁCE 2: PODROBNÉ FENOTYPOVÉ CHARAKTERISTIKY GLA VARIANT IDENTIFIKOVANÝCH V RÁMCI CELOSTÁTNÍHO SCREENINGU PACIENTŮ S CÉVNÍ MOZKOVOU PŘÍHODOU V ČESKÉ REPUBLICCE .....	8
2.3. PRÁCE 3: CEREBROVASKULÁRNÍ FENOTYP U PACIENTŮ S FABRYHO CHOROBOU HODNOCENÝ POMOCÍ ULTRAZVUKU .....	9
2.4. PRÁCE 4. PREDIKTORY CEREBROVASKULÁRNÍCH ABNORMIT U PACIENTŮ S FABRYHO CHOROBOU (2. TEMATICKÝ OKRUH) .....	9
<b>3. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>10</b>
3.1. PRÁCE 1: STANOVENÍ PREVALENCE FABRYHO CHOROBY .....	10
3.2. PRÁCE 2: PODROBNÉ FENOTYPOVÉ CHARAKTERISTIKY GLA VARIANT IDENTIFIKOVANÝCH V RÁMCI CELOSTÁTNÍHO SCREENINGU PACIENTŮ S CÉVNÍ MOZKOVOU PŘÍHODOU V ČESKÉ REPUBLICCE .....	10
3.3. PRÁCE 3: CEREBROVASKULÁRNÍ FENOTYP U PACIENTŮ S FABRYHO CHOROBOU HODNOCENÝ POMOCÍ ULTRAZVUKU (2. TEMATICKÝ OKRUH) .....	10
3.4. PRÁCE 4. PREDIKTORY CEREBROVASKULÁRNÍCH ABNORMIT U PACIENTŮ S FABRYHO CHOROBOU (2. TEMATICKÝ OKRUH) .....	11
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>11</b>
4.1. PRÁCE 1: STANOVENÍ PREVALENCE FABRYHO CHOROBY .....	11
4.2. PODROBNÉ FENOTYPOVÉ CHARAKTERISTIKY GLA VARIANT IDENTIFIKOVANÝCH V RÁMCI CELOSTÁTNÍHO SCREENINGU PACIENTŮ S CÉVNÍ MOZKOVOU PŘÍHODOU V ČESKÉ REPUBLICCE .....	11
4.3. PRÁCE 3: CEREBROVASKULÁRNÍ FENOTYP U PACIENTŮ S FABRYHO CHOROBOU HODNOCENÝ POMOCÍ ULTRAZVUKU .....	12
4.4. PRÁCE 4. PREDIKTORY CEREBROVASKULÁRNÍCH ABNORMIT U PACIENTŮ S FABRYHO CHOROBOU .....	12
<b>5. DISKUSE</b> .....	<b>13</b>

<b>6. ZÁVĚRY, ZHODNOCENÍ CÍLŮ A HYPOTÉZ.....</b>	<b>14</b>
PRÁCE Č. 1. STANOVENÍ PREVALENCE FABRYHO CHOROBY U PACIENTŮ S IKTEM V ČR.....	14
PRÁCE Č. 2: PODROBNÉ FENOTYPOVÉ CHARAKTERISTIKY GLA VARIANT IDENTIFIKOVANÝCH V RÁMCI CELOSTÁTNÍHO SCREENINGU PACIENTŮ S CÉVNÍ MOZKOVOU PŘÍHODOU V ČESKÉ REPUBLICCE.....	15
PRÁCE Č. 3: CEREBROVASKULÁRNÍ FENOTYP U PACIENTŮ S FABRYHO CHOROBOU HODNOCENÝ POMOCÍ ULTRAZVUKU .....	15
PRÁCE Č. 4: PREDIKTORY CEREBROVASKULÁRNÍHO POSTIŽENÍ HODNOCENÉHO POMOCÍ ULTRAZVUKU A MAGNETICKÉ REZONANCE U PACIENTŮ S FABRYHO CHOROBOU .....	16
<b>7. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>8. SEZNAM PUBLIKACÍ:.....</b>	<b>19</b>
1. PUBLIKACE <i>IN EXTENSO</i> , KTERÉ JSOU PODKLADEM DISERTAČNÍ PRÁCE .....	19
2. PUBLIKACE <i>IN EXTENSO</i> BEZ VZTAHU K TÉMATU DISERTAČNÍ PRÁCE .....	19

## 1. Úvod

Fabryho choroba (FCh, OMIM 301500) je vzácné onemocnění vázané na chromozom X. Patogenní varianty genu GLA vedou k dysfunkci lysozomálního enzymu alfa-galaktosidázy A ( $\alpha$ -Gal A; EC 3.2.1.22).<sup>1,2</sup> Deficit lysozomálního  $\alpha$ -Gal A vede k narušení části katabolické dráhy glykosfingolipidů s následnou akumulací substrátu v různých orgánech a tkáních (Germain, 2010). Změny související s akumulací a další patofyziologické důsledky spojené s enzymopatií vedou nakonec pod vlivem modifikujících faktorů ke klinické manifestaci onemocnění. Fenotypy FCh jsou heterogenní, od pozdních manifestací, obvykle omezených na jeden orgán (tzv. late-onset formy), až po závažné multiorgánové postižení, které obvykle začíná již v dětství (tzv. klasické formy). Hemizygotní muži jsou většinou postiženi závažněji než heterozygotní ženy. Obecně je výskyt variant rezultujících v klasický fenotyp odhadován v rozmezí od 1: 25 000 do 1:40 000, varianty s pozdním začátkem jsou asi 10x častější (Desnick, 2015).

Cévní mozkové příhody (CMP) patří vedle kardiálního a renálního postižení mezi významné faktory určující morbiditu a mortalitu pacientů s FCh a mohou být prvním klinickým projevem nemoci (Sims et al., 2009). Mechanismy, které jsou se podílejí na patofyziologii vzniku CMP u FCh, jsou komplexní a nejsou zcela objasněny. Důležitou roli ve fenotypové manifestaci FCh hraje strukturální a funkční poškození cévního systému (Moore et al., 2002; Barbey et al., 2006; Kallikokoski et al., 2006), které může vést k CMP.

Dostupnost specifické terapie a snadnějších diagnostických metod, které představuje především testování technikou suché krevní kapky (dry blood spot, DBS) (Chamoles et al., 2001) vedla ke zvýšenému úsilí o diagnostiku FCh, včetně screeningových programů v (pro FCh) rizikových populacích (Doheny et al., 2018), například u mladých pacientů s iktem (Rolfs et al., 2005; Brouns et al., 2010; Rolfs et al., 2013)

Přestože screeningové programy mohou být nástrojem k identifikaci pacientů, odhalují také genové varianty, které bez následné podrobné analýzy biochemického a klinického fenotypu, mohou vést ke nesprávnému zařazení nalezené varianty. Diferenciální diagnostika klinických příznaků může být problematická, a to zejména mezi později nastupujícími projevy FCh (včetně cerebrovaskulárních) a podobnými chronickými nemocemi vyskytujícími se v běžné populaci. Nesprávné zařazení varianty z hlediska patogenity pak 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 je důležité sdílet údaje pacientů a umožnit

integraci genetických a klinických informací s cílem předejít chybné interpretaci varianty s nutností pozdější reklasifikace.

Ultrazvuk je dostupná neinvazivní metoda používaná pro strukturální zobrazení a hodnocení parametrů krevního průtoku extrakraniálního segmentu karotických tepen. Transkraniální barevně kódovaná duplexní sonografie (TCCS) se běžně používá k analýze intrakraniálních cév (Bartels et al., 1995). Měření indexu zadržetí dechu (BHI) pomocí TCCS umožňuje neinvazivní hodnocení cerebrovaskulární vazoreaktivity (CVR). Postižení vazoreaktivity bylo popsáno u některých nemocí mozku, včetně CMP (Markus a Harrison, 1992; Silvestrini et al., 1995), kognitivních poruch (Silvestrini et al., 2000; Urbanova et al., 2018) a migrény (Fiermonte et al., 1999; Akgün et al., 2015).

## **2. Hypotézy a cíle práce**

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

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

### **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)**

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. Předpokládali jsme, že v rizikové skupině neselektovaných pacientů s CMP identifikujeme dosud nediagnostikované pacienty s FCh. Předpokládali jsme dále, že identifikujeme rovněž nové varianty GLA genu. Ve druhé části jsme pak naplánovali podrobnou fenotypovou analýzu k zařazení GLA variant (korelace genotyp-fenotyp).

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

**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.



Hlavním cílem první části prvního tematického okruhu, bylo stanovení prevalence Fabryho choroby v rizikové populaci pacientů s akutní CMP, zhodnocení nutnosti rutinního screeningu FCh u neselektovaných pacientů s iktem, respektive stanovení jeho relevantnosti v rámci podskupin nemocných s CMP. 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 přehodnocování.

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

### **2.4. Práce 4. Prediktory cerebrovaskulárních abnormit u pacientů s Fabryho chorobou (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 se spolupodílem klasických vaskulárních rizikových faktorů. Předpokládali jsme výraznější vaskulární postižení u nemocných s FCh v porovnání s kontrolami bez tohoto onemocnění. Dále jsme předpokládali, že v populaci pacientů s FCh se budou na výraznějším postižení cév podílet nejen klasické rizikové faktory, ale také tíže samotné FCh.

#### **Hypotéza č. 3:**

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

#### **Hypotéza 4:**

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

Cílem neurosonologické studie bylo pomocí analýzy případů a kontrol zhodnotit přítomnost a tíži vybraných strukturálních (šíře intimo-medie v distální společné krkavici (cIMT), šíře vertebrální tepny ve V2 úseku) a hemodynamických vaskulárních charakteristik CNS (střední průtoková rychlost, pulzatilní index (PI) a CVR na arteria cerebri media) a dále v kohortě pacientů s FCh určit mezi vybranými klinickými parametry prediktory výraznějšího vaskulárního postižení. V kohortové studii byly zkoumané charakteristiky navíc rozšířeny o

strukturální léze na magnetické rezonanci mozku (léze v oblasti bílé hmoty). Vybrané parametry zahrnovaly jak ovlivnitelné a neovlivnitelné klasické rizikové faktory CMP, tak faktory vázané specificky na Fabryho chorobu.

### **3. Materiál a metodika**

#### **3.1. Práce 1: Stanovení prevalence Fabryho choroby**

Studie byla prospektivní, multicentrická, probíhala ve 35 centrech pro léčbu cévních mozkových příhod v České republice. Nábor pacientů probíhal postupně, během tří určených měsíců. Studie se zúčastnilo celkem 986 subjektů. Klinické údaje jsme shromažďovali v databázi Registry of Stroke Care Quality (RES-Q). Přítomnost variant GLA genu a FCh jsme stanovovali metodou DBS ve dvou krocích. U mužů stanovením aktivity enzymu  $\alpha$ -Gal A a kvantifikací biomarkeru FCh globotriaosylsingosinu, tzv. lysoGb3. V případě positivity následovalo sekvenování genu GLA. U žen bylo prováděno rovnou sekvenování GLA a stanovení hladiny lyso-Gb3. Data jsme analyzovali metodami popisné a srovnávací statistiky.

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

Na základě výsledků předchozí práce (16 pacientů s variantami GLA genu) a podrobné analýzy rodokmenů (dalších 7 subjektů s variantami GLA genu) jsme do studie zařadili celkem 23 subjektů s osmi různými variantami GLA. Pacienti podstoupili komplexní detailní strukturované vyšetření případných orgánových manifestací FCh (neurologické, včetně kvantitativního testování senzitivity a analýzy výsledků z likvoru u případů s patogenními variantami genu, MRI mozku, sonografického zobrazení tepen, oční, kožní, kardiologické včetně echokardiografie a EKG, laboratorní včetně stanovení renálních parametrů). Vyšetření provedl tým specialistů na FCh.

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

V této práci jsme provedli monocentrickou průřezovou studii, které se zúčastnilo celkem 154 osob, z toho 130 osob - 65 pacientů (38 žen) s geneticky potvrzenou FCh a 65 kontrol odpovídajících pohlaví a věk – bylo zahrnuto do konečné analýzy. Pomocí ultrasonografie jsme měřili strukturální a hemodynamické parametry, včetně tloušťky cIMT, vnitřního

průměru vertebrální tepny, rychlosti průtoku krve v klidu, indexu pulzatility a CVR ve střední mozkové tepně. K posouzení rozdílů mezi FCh a kontrolami a k identifikaci faktorů ovlivňujících pozorované výsledky zkoumaných parametrů byly použita regresní analýza.

### **3.4. Práce 4. Prediktory cerebrovaskulárních abnormit u pacientů s Fabryho chorobou (2. tematický okruh)**

V této kohortové studii jsme vyšetřili celkem 85 pacientů s FCh. Všichni pacienti byli nositelé patologické varianty GLA genu. 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). U všech pacientů jsme spočítali MSSI (Meinz Severity Scale Index) skóre, které charakterizuje tíži FCh (Whybra et al., 2004). Statistické zpracování jsme provedli s pomocí jednorozměrné a mnohorozměrné analýzy v několika prediktivních modelech.

## **4. Výsledky**

### **4.1. Práce 1: Stanovení prevalence Fabryho choroby**

Do studie bylo zařazeno celkem 986 pacientů (54 % mužů, průměrný věk 70 let). Rozložení typů CMP bylo následující: ischemický v 79 %, tranzitorní ischemická ataka (TIA) ve 14 %, intracerebrální krvácení (ICH) v 7 %, subarachnoidální krvácení v 1 % a trombóza mozkových žil v 0,1 %. Dva (0,2 %, 95% CI 0,02-0,7) pacienti měli patogenní variantu GLA genu (c.1235\_1236delCT a p.G325S). Dalších čtrnáct (1,4 %, 95% CI 0,08-2,4) pacientů mělo variantu genu GLA nejasného významu (9 s p.D313Y, jeden p.A143T, jeden p.R118C, jeden p.V199A, jeden p.R38G). Identifikovali jsme novou variantu R30K. Nositelé patogenních variant měli lakunární typ ischemické CMP, u ostatních 14 nositelů variant genu GLA bylo 11 mozkových příhod ischemických, dvě TIA a jedna ICH. Pacienti s pozitivním ve srovnání s negativním screeningem genu GLA byli mladší (průměr 60±SD, min, max, vs 70±SD, min, max, P = 0,02). V ostatních základních proměnných jsme rozdíly nepozorovali

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

Vyšetření vedlo k návrhu reklasifikace fenotypu pro mutaci G325S z pozdní na klasickou. Byla nalezena nová varianta R30K, která byla klasifikována jako varianta neznámého

významu (VUS). Typickým projevem u našich pacientů s FCh byla cévní mozková příhoda vzniklá v zadní cirkulaci s doprovodným patologickým nálezem v mozkomíšním moku. Dále jsme potvrdili, že cornea verticillata je typicky spojena s klasickými variantami. Naše zjištění podtrhují význam podrobného popisu fenotypu a sdílení dat pro správnou identifikaci patogenity genových variant zjištěných v rámci screeningových programů pro vysoce rizikové populace.

#### **4.3. Práce 3: Cerebrovaskulární fenotyp u pacientů s Fabryho chorobou hodnocený pomocí ultrazvuku**

Celkem 65 pacientů s FCh (38 žen, průměrný věk 47,24, SD 13,40; 27 mužů průměrný věk 47,56; SD 12,02) a 65 kontrolních subjektů bez FCh (38 žen, průměrný věk 47,50, SD 13,25 a 27 mužů, průměrný věk 47,78, SD 12,00) podstoupilo neurosonologickou analýzu. Ve srovnání s kontrolami odpovídajícími pohlavím a věkem vykazovali pacienti s FCh významně zvětšenou tloušťku cIMT (pacienti s FCh  $0,69 \pm 0,13$  mm oproti kontrolám  $0,63 \pm 0,12$  mm;  $P_{adj} = 0,0014$ ), větší průměr vertebrální tepny (pacienti s FCh  $3,59 \pm 0,35$  mm oproti kontrolám  $3,5 \pm 0,35$  mm), vyšší PI středních mozkových tepen (pacienti s FCh  $0,98 \pm 0,19$  oproti kontrolám  $0,87 \pm 0,11$ ;  $P_{adj} < 0,0001$ ) a významně sníženou CVR (pacienti s FCh  $1,21 \pm 0,49$  oproti kontrolám  $1,35 \pm 0,38$ ;  $P_{adj} = 0,0409$ ) po korekci na věk, BMI a pohlaví. Pacienti s FCh měli navíc významně vyšší variabilitu CVR ( $0,48 \pm 0,25$  oproti  $0,21 \pm 0,14$ ;  $P_{adj} < 0,0001$ ).

#### **4.4. Práce 4. Prediktory cerebrovaskulárních abnormit u pacientů s Fabryho chorobou**

Studie se zúčastnilo 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. Jako nejvýznamnější prediktory pro strukturální zkoumané charakteristiky jsme identifikovali věk a tíži postižení určenou MSSÍ skórem. U hemodynamických charakteristik jsme určili kromě věku a MSSÍ ještě také pohlaví a tepovou frekvenci. Pro parametr variability CVR jsme jako jediný signifikantním prediktor identifikovali MSSÍ skóre. Přestože jsme ve studii případů a kontrol pozorovali pouze trend k výraznějším poklesu střední průtokové rychlosti na ACM u pacientů s FCh, v kohortové části práce se věk ukazoval jako velmi významný prediktor poklesu průtokové rychlosti ve všech modelech.

## 5. Diskuse

Tato disertační práce předkládá v rámci dvou tematických okruhů výsledky čtyř studií, které se zabývaly neurologickými projevy (s důrazem na cerebrovaskulární problematiku) u pacientů s Fabryho nemocí. 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 stanovení prevalence FCh u pacientů s akutní CMP a následnou podrobnou analýzu všech osmi nalezených variant GLA genu. Celkem jsme nově diagnostikovali pět pacientů s FCh. Naše prospektivní screeningová studie u pacientů s CMP ukázala, že prevalence FCh v této populaci je poměrně vysoká (0,2 %). Tento výskyt je srovnatelný s prevalencí 0,13 % u mužů a 0,14 % u žen, kterou uvádí poslední metaanalýza screeningových programů (Doheny et al., 2018). Screeningové studie v „rizikových populacích“ však mohou generovat nálezy genových variant, které bez podrobné analýzy fenotypu mohou vést ke 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. 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 variant nejasného významu (VUS), a to včetně asymptomatických nosičů variant. Získané klinické údaje mohou v budoucnu pomoci objasnit fenotypové korelace alel (odlišit symptomy FCh od nesespecifických 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 50ti let. Výsledky naší práce se odrazily v návrhu postupu stran diagnostiky FCh jako příčiny CMP, který schválil výbor Cerebrovaskulární sekce České neurologické společnosti Jana Evangelisty Purkyně.

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. V souladu s předchozími pozorováními jiných autorů

(Boutouyrie et al., 2002; Vujkovic et al., 2021) jsme potvrdili jsme větší tloušťku cIMT. Dále jsme pozorovali širší průměr vertebrální tepny. Přestože jiní autoři se zabývali dilatační arteriopatií u pacientů s FCh (Fellgiebel et al., 2009; Fellgiebel et al., 2011; Vujkovic et al., 2021), pokud je nám známo, rozšíření vertebrální tepny dosud nebylo popsáno. U pacientů s FCh jsme prokázali zvýšený PI, což může odrážet nejen periferní cévní rezistenci (Mok et al., 2012; Nam et al., 2020), ale rovněž tuhost proximálního cévního řečiště (Climie et al., 2019). Jako možný nový specifický fenotyp FCh výraznější variabilitu CVR 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 abnormit a lézí bílé hmoty na MRI mozku. Jako hlavní prediktory vaskulárních změn jsme identifikovali věk a celkovou tíži nemoci hodnocenou pomocí MSSI. U parametru variability BHI (BHIvar) se jako jediným signifikantním prediktorem jevil MSSI. Tento zajímavý nálezn absence signifikantního vlivu ostatních zkoumaných prediktorů na BHIvar. opět naznačuje, že variabilita BHI může být specifickým fenotypovým projevem. Určitý vliv může mít rovněž přítomnost klasických vaskulárních rizikových faktorů. FCh 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 abnormit, potažmo komplikací obecně. K odpovědi na tuto otázku je zapotřebí dalšího zkoumání.

## **6. Závěry, zhodnocení cílů a hypotéz**

### **Práce č. 1. Stanovení prevalence Fabryho choroby u pacientů s iktem v ČR**

**Hypotéza č. 1:** Mezi pacienty s akutní CMP se nacházejí dosud nedignostikovaní 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.

## **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.

## **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 CVR na ACM u pacientů s FCh. Jako možný nový fenotyp specifický pro FCh jsme detekovali podstatně vyšší variabilitu reaktivity mozkových cév v odpovědi na test zadržetí dechu. Prokázali jsme zvýšený pulzatilní index 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.

#### **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 MSSÍ.

## **7. Použitá literatura**

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.

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 2006, 95(451), 63-68.

BARTELS, E., H. H. FUCHS AND K. A. FLÜGEL Color Doppler imaging of basal cerebral arteries: normal reference values and clinical applications. *Angiology*, Oct 1995, 46(10), 877-884.

BOUTOUYRIE, P., S. LAURENT, B. LALOUX, O. LIDOVE, et al. Arterial remodelling in Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl*, 2002, 91(439), 62-66.

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.



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.

DESNICK, R. Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease 2015.

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.

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.

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.

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.

GERMAIN, D. P. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis*, Nov 22 2010, 5, 30.

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.

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.

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.

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.

MOORE, D. F., G. ALTARESCU, P. HERSCOVITCH AND R. SCHIFFMANN Enzyme replacement reverses abnormal cerebrovascular responses in Fabry disease. *BMC Neurol*, Jun 18 2002, 2, 4.

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.

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.

ROLFS, A., F. FAZEKAS, U. GRITTNER, M. DICHGANS, et al. Acute cerebrovascular disease in the young: the Stroke in Young Fabry Patients study. *Stroke*, Feb 2013, 44(2), 340-349.

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.

SILVESTRINI, M., F. VERNIERI, P. PASQUALETTI, M. MATTEIS, et al. Impaired cerebral vasoreactivity and risk of stroke in patients with asymptomatic carotid artery stenosis. *Jama*, Apr 26 2000, 283(16), 2122-2127.

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.

URBANOVA, B. S., J. P. SCHWABOVA, H. MAGEROVA, P. JANSKY, et al. Reduced Cerebrovascular Reserve Capacity as a Biomarker of Microangiopathy in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimers Dis*, 2018, 63(2), 465-477.

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.

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.

## 8. Seznam publikací:

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

#### a) s impakt faktorem

TOMEK, A\*., **REKOVÁ, P\*.**, 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.**, DOSTALOVA, G., ROB D., VANECKOVA, M., et al. Cerebrovascular Phenotype in Fabry Disease Patients Assessed by Ultrasound. Journal of Ultrasound in Medicine. Doi. doi: 10.1002/jum.1654. Online ahead of print.

IF = 2,754

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

IF – 0,377

#### b) bez impakt faktorů

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

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

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

### 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 hospitalizations, aneurysm treatment and in-hospital mortality. 1-year follow-up. J Neurol Neurosurg Psychiatry, Jul 28:2022

**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

(\*spoluautor **REKOVA, P**)

b) bez impakt faktorů

žádné