

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program: Neurovědy



**MUDr. Daniel Baumgartner**

Neurogenetické, biochemické a kognitivní aspekty  
familiární i sporadické formy amyotrofické laterální sklerózy  
v populaci České republiky

Neurogenetic, biochemical and cognitive aspects  
of familial and sporadic forms of amyotrophic lateral sclerosis  
in Czech population

Disertační práce

Školitel: MUDr. Radim Mazanec, Ph.D.

Konzultant: prof. MUDr. Jakub Hort, Ph.D.

Praha, 2024

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval 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, 11.09.2024

DANIEL BAUMGARTNER

.....

## **Poděkování**

V první řadě děkuji svému školiteli MUDr. Radimu Mazancovi, Ph.D. za odborné vedení, motivaci a trpělivost v průběhu studia. Velké poděkování patří RNDr. Jitce Hanzalové, která vedla laboratorní diagnostiku v rámci studie, zaměřené na zhodnocení neurofilament a rovněž mgr. Zuzaně Mušové, Ph.D., za provedení molekulárně genetických testů, cenné nápady a rady. Dále chci poděkovat všem spoluautorům publikací, na jejichž podkladě byla sestavena tato disertační práce.

# Neurogenetické, biochemické a kognitivní aspekty familiární i sporadické formy amyotrofické laterální sklerózy v populaci České republiky

## Abstrakt

Tato dizertační práce chce upozornit na úskalí diagnostiky ALS a zároveň na rizika chybné diagnózy; dále pak zhodnotit profil genetických variant u českých pacientů s ALS. Tato data dosud zcela chybí a aktuální terapeutické trendy směřují léčbě, cílené na základě genetické etiologie. Prvním cílem práce je zhodnotit diagnostické parametry testů, stanovujících hladiny lehkých (NfL) a fosforylovaných těžkých (p-NfH) řetězců neurofilament v likvoru a séru; obzvláště v diferenciálně diagnosticky složitých situacích. Vedlejším cílem je definovat determinanty hladin neurofilament. Druhým cílem je pilotní analýza frekvence genetických variant u pacientů z ČR. Vedlejším cílem je nalézt klinické prediktory pravděpodobného záchytu kauzální mutace. Naše výsledky prokázaly u pacientů s jasně vyjádřeným klinickým obrazem ALS velmi dobrou a vůči sobě srovnatelnou diagnostickou efektivitu hladin obou řetězců neurofilament v likvoru, které tak mohou být využity jako opora definitivní diagnózy. Na druhou stranu, varianty s neúplně vyjádřeným fenotypem ALS, nebo s pomalou progresí jsou asociovány s nižšími hladinami neurofilament. Naopak u relevantních alternativních diagnóz (komprese nervových struktur) vede rozsáhlé axonální poškození k jejich výrazné elevaci, což limituje jejich využití v diagnosticky obtížných situacích. Studie, hodnotící zastoupení genetických variant u českých pacientů, prokázala nejvyšší frekvenci HRE v *C9orf72*, tak jako v ostatních evropských kohortách. Bulbární region rozvoje, resp. komorbidní FTD jsou u sporadických pacientů asociovány s větší pravděpodobností detekce této varianty.

## Klíčová slova

Amyotrofická laterální skleróza, biomarkery, *C9orf72*, frontotemporální demence, genové varianty, likvor, neurofilamenta, neurogenetika, sekvenování nové generace

# **Neurogenetic, biochemical and cognitive aspects of familial and sporadic forms of amyotrophic lateral sclerosis in Czech population**

## **Abstract**

This thesis aims to highlight the pitfalls and risks of diagnosis and misdiagnosis in ALS and to evaluate the profile of genetic variants among Czech ALS patients. These data are still completely lacking and current therapeutic trends are directed towards gene-targeted treatment. The first main objective of the study is to evaluate the diagnostic parameters of tests determining the levels of light (NfL) and phosphorylated heavy (p-NfH) neurofilament chains in the cerebrospinal fluid and serum; especially in clinically difficult-to-distinguish situations. A secondary objective is to define the determinants of neurofilament levels. The second main objective is a pilot study on the frequency of genetic variants among Czech patients. A secondary objective is to find clinical predictors of a causal mutation. Our results have shown that in patients with a typical ALS phenotype, the diagnostic performance of both neurofilaments in the cerebrospinal fluid is very good and comparable to each other, and, therefore, can be used to support the diagnosis. On the other hand, variants with incomplete ALS phenotype or slow progression are associated with lower neurofilament levels. Conversely, in relevant alternative diagnoses (compression of roots or myelom), extensive axonal damage leads to their marked elevation, limiting their use in difficult-to-distinguish situations. The study on genetic variants in Czech patients showed the highest frequency of HRE in *C9orf72*, as in other European cohorts. Bulbar region of development or comorbid FTD is associated with a higher probability of detecting this variant in sporadic patients.

## **Keywords**

Amyotrophic lateral sclerosis, biomarkers, *C9orf72* repeat expansion, cerebrospinal fluid, frontotemporal dementia, gene variants, neurofilaments, neurogenetics, next-generation sequencing

## SEZNAM ZKRATEK

<b>ALS</b>	Amyotrofická laterální skleróza
<b>ALSFRS-R</b>	Amyotrophic lateral sclerosis functional rating scale-revised, revidovaná škála funkčních dovedností u ALS
<b>fALS</b>	familiární forma nemoci ALS
<b>C9orf72</b>	Chromosome 9 open reading frame 72 gene, gen s otevřeným čtecím rámcem 72 na 9. chromozomu (v jehož 1. intronu se vyskytuje expanzní repetice C <sub>4</sub> C <sub>2</sub> )
<b>CMT</b>	Charcot Marie Tooth nemoc - hereditární motorická a senzitivní polyneuropatie
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, metoda detekce a kvantifikace antigenů
<b>EMG</b>	Elektromyografie
<b>FTD</b>	Frontotemporální demence
<b>FUS</b>	Protein „Fused-in-Sarcoma“, resp. gen, kódující tento protein
<b>GWAS</b>	Genome-wide association studies, celogenomové studie asociace
<b>HRE</b>	Hexanucleotide repeat expansion – oblast šestinukleotidové repetice v genu <i>C9orf72</i>
<b>MND</b>	Motor-neuron disease, (neurodegenerativní) onemocnění motoneuronů
<b>NGS</b>	Next-generation sequencing - metoda sekvenování DNA nové generace
<b>NfL</b>	Neurofilament light chain - lehký řetězec neurofilament
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction - metoda polymerázová řetězová reakce
<b>PLS</b>	Primární laterální skleróza - fenotypová varianta ALS
<b>PMA</b>	Progresivní muskulární atrofie - fenotypová varianta ALS
<b>p-NfH</b>	phosphorylated neurofilament heavy chain - fosforylovaný těžký řetězec neurofilament
<b>sALS</b>	sporadické formy ALS
<b>SOD-1</b>	superoxiddismutasa-1, Cu/Zn metaloproteinový enzym (resp. jeho kódují gen)
<b>TARDBP</b>	Gen, kódující protein TDP-43
<b>TDP-43</b>	Transactive response DNA binding protein 43 kDa – DNA-vázající protein s transaktivní reakcí s hmotností 43 kilodalton
<b>WGS</b>	Whole-genome sequencing - celogenomové sekvenování DNA

## OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	9
<b>1.1. Amyotrofická laterální skleróza – úvod do problematiky</b> .....	9
<b>1.2. Epidemiologie</b> .....	10
<b>1.3. Etiopatogeneze</b> .....	11
1.3.1. Genetické faktory .....	12
1.3.2. Exogenní faktory .....	14
1.3.3. Patofyziologie.....	16
<b>1.4. Klinická prezentace a diagnostické možnosti</b> .....	20
1.4.1. Klinický obraz .....	20
1.4.2. Diagnostická kritéria .....	23
1.4.3. Biomarkery.....	26
<b>1.5. Management</b> .....	29
<b>2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY</b> .....	31
<b>2.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS</b> .....	31
<b>2.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS</b> .....	32
<b>3. METODIKA</b> .....	34
<b>3.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS</b> .....	34
3.1.1. Charakteristika souboru.....	34
3.1.2. Stanovení hladin neurofilament .....	36
3.1.3. Statistická analýza .....	37
<b>3.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS</b> .....	38
3.2.1. Charakteristika souboru.....	38
3.2.2. Metody molekulárně genetického vyšetření a analýzy .....	40
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	44
<b>4.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS</b> .....	44
4.1.1. Srovnání klinických a demografických znaků .....	44
4.1.2. Koncentrace neurofilament a dalších biochemických analytů.....	45
4.1.3. Korelace mezi biochemickými a klinickými ukazateli .....	52
4.1.4. Diagnostická přesnost neurofilament pro odlišení ALS od ostatních jednotek .	53
<b>4.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS</b> .....	61
4.2.1. Varianty s kauzálním významem pro rozvoj ALS .....	61
4.2.1. Varianty s nejasným významem .....	64

<b>5. DISKUZE</b> .....	67
<b>5.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS</b> .....	67
<b>5.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS</b> .....	73
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	81
<b>7. SOUHRN</b> .....	83
<b>8. SUMMARY</b> .....	84
<b>9. LITERATURA</b> .....	85
<b>10. SEZNAM PUBLIKACÍ</b> .....	112
<b>11. PŘÍLOHY</b> .....	114

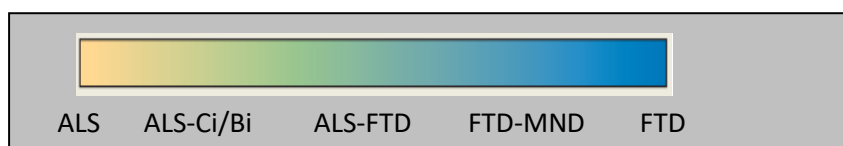


# 1. ÚVOD

## 1.1. Amyotrofická laterální skleróza – úvod do problematiky

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je fatální neurodegenerativní onemocnění dospělých, postihující predominantně motorický systém volní hybnosti, tzn. kortikální motoneurony mozku a  $\alpha$ -motoneurony příslušných jader mozkového kmene a míchy. Název reflektuje základní klinicko-patologické charakteristiky tohoto onemocnění: ztrátu svalové hmoty (amyotrofie) a dále axonální ztrátu dlouhých kortikospinálních drah, probíhajících v laterálních míšních sloupcích (laterální skleróza). Onemocnění se typicky manifestuje jako fokální, nebolestivé oslabení kosterních svalů či ztráta obratnosti. Následně dochází s různou dynamikou k progresi symptomů do sousedních, nebo i vzdálených tělesných regionů. Kromě zániku motorických neuronů a jejich axonů jsou hlavními histopatologickými nálezy intracelulární cytoplazmatické inkluze eozinofilních Bunina tělísek a rovněž hyperfosforylované, ubikvitované agregáty transaktivního, DNA vázajícího proteinu o délce 43 kDa (TDP-43) (Arai T. et al., 2006). Na základě zjištění, že agregáty identického proteinu jsou, byť s odlišnou regionální distribucí na mikro- i makroskopické úrovni, nalézány u ~ 50% všech pacientů s frontotemporální demencí (FTD) (Neumann M. et al., 2006), vznikla nová, ucelující koncepce TDP-43 proteinopatie jakožto klinicko-patologického kontinua těchto dvou jednotek, tedy FTD a ALS (Obr. 1) (Geser F. et al., 2009). Tento koncept představoval odklon od historicky zažitého chápání ALS jako selektivního postižení somatomotorického systému, kdy souběžný výskyt demence byl klasifikován jako atypická forma nemoci (Brooks BR. et al., 2000). Následně nezávislé neuropsychologické studie dokumentovaly u pacientů s ALS relativně častý výskyt plně vyjádřené FTD (5-15 %), resp. u 20-35% lehký kognitivní deficit či behaviorální poruchy frontálního typu, nesplňující kritéria FTD (Phukan J. et al., 2012; Oh SI. et al., 2014; Montushi A. et al., 2015). Na druhé straně byly u asi 30 % pacientů s FTD prokázány klinické, nebo elektrofyziologické známky lehké dysfunkce kortikálních, resp. spinálních  $\alpha$ -motoneuronů a u 12,5 % plně vyjádřená forma ALS (Burrell JR. et al., 2011). Předchozí dekáda přinesla exponenciální nárůst nově popsáných genetických variant, rizikových pro rozvoj nemoci. S tímto poznáním se objevily důkazy pro genovou pleiotropii těchto variant, tzn. schopnost, manifestovat se odlišnými fenotypy, resp. nozologickými jednotkami (kromě ALS a FTD např. Parkinsonské syndromy, Huntingtonské fenokopie apod.). Nejmarkantněji je tento efekt vyjádřen u hexanukleotidové expanze v genu *C9orf72*, která je zároveň nejčastěji detekovanou příčinou ALS i FTD (Cooper-Knock J. et al., 2015; Canas A. et al., 2013; Elden AC. et al.,

2010). Morfometrické studie s využitím MRI poté prokázaly postižení kortexu i cerebrální bílé hmoty, přesahující primární motorické oblasti, převážně u pacientů s ALS a souběžným kognitivním deficitem, popř. plně vyjádřenou FTD (Westeneng HJ. et al., 2016; Bede P. et al., 2018). Při zohlednění všech výše uvedených poznatků tak v současné době převládá koncepce ALS jakožto syndromu, nikoliv ucelené nozologické jednotky (van Es MA. et al., 2020).



ALS-Ci: ALS s lehkou kognitivní dysfunkcí (nesplní kritéria pro FTD), ALS-Bi: ALS s lehkou behaviorální poruchou (nesplní kritéria pro behaviorální variantu FTD), ALS-FTD: splní kritéria obou jednotek současně, FTD-MDN: splní kritéria FTD, mírné zn. dysfunkce motoneuronů, nesplní revidovaná El Escorial kritéria, FTD: splní jen kritéria frontotemporální demence

**Obr. 1** Spektrum ALS-FTD syndromů (se svolením Macmillan Publishers Ltd: Nat Rev Neurosci., Robberecht W., Philips T., The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis Mar 6, 2013)

Klinická prezentace ALS tudíž představuje soubor relativně heterogenních subtypů s výraznou variabilitou postižení kortikálních, bulbárních a spinálních  $\alpha$ -motoneuronů, příp. spolu s kognitivním deficitem. Tyto varianty onemocnění se poté navzájem relativně významně odlišují prognózou délky přežití (Swinnen B. a Roberecht W., 2014). Zmíněná klinická heterogenita ovšem komplikuje včasnou diagnózu, resp. adekvátně stanovenou prognózu u konkrétního individuálního pacienta. Zároveň je velmi pravděpodobně odrazem heterogenity na úrovni iniciální celulární patofyziologie, na které se může podílet řada různých genetických, stejně jako environmentálních kauzálních faktorů (van ES MA. et al., 2020; Bendotti E. et al., 2020). Absence jednotné etiologie poté komplikuje detailní a ucelené pochopení patofyziologie nemoci, což představuje významnou překážku pro nalezení účinné, průběh choroby modifikující léčby.

## 1.2. Epidemiologie

Incidence a prevalence onemocnění se celosvětově významně liší a veškerá data konzistentně ukazují nejvyšší výskyt v populacích evropského původu. Dle rozsáhlých metaanalýz se v populacích evropského původu pohybuje incidence v rozmezí 1,49 až 2,76 na 100 000; prevalence poté mezi 4,8 až 9,62 na 100 000 (Marin B. et al., 2017; Xu L. et al., 2020). Pro jedince evropského původu byl kalkulován odhad celoživotního rizika rozvoje onemocnění jako cca. 1:350 u mužů a 1:400 u žen (Johnston CA. et al., 2006; Al-Chalabi A. a Hardiman O., 2013). Naproti tomu jihoasijské nebo jihoamerické populace

vykazují incidenci 0,42, resp. 0,87 na 100.000 (Xu L. et al., 2020). Incidence onemocnění plynule narůstá až do 8. dekády s maximem v 7. dekádě (Xu L. et al., 2020). Podkladem pro geografickou variabilitu v distribuci incidence a prevalence je tedy pravděpodobně kombinace odlišného genetického pozadí konkrétní populace a zároveň významný rozdíl v očekávané délce dožití v důsledku socio-ekonomických rozdílů mezi regiony. Vliv delší délky dožití na incidenci onemocnění podporují výsledky longitudinální Gompertziánské analýzy, prokazující nárůst mortality v důsledku ALS v populaci s narůstající průměrnou délkou dožití (Riggs JE. et al., 1990). Muži jsou mírně častěji postižení, než ženy – dle recentních údajů je poměr zastoupení mužů a žen 1,3: 1 (Fontana A. et al., 2021). Nejpravděpodobnějšími zvažovanými faktory, kterými pohlavní dimorfismus ovlivňuje častější výskyt onemocnění u mužů, je vliv pohlavních hormonů (protektivní efekt estrogenu), vyšší expozice exogenním noxám, resp. vyšší frekvence repetitivního traumatického poškození mozku (Zamani A. et al., 2024).

### **1.3. Etiopatogeneze**

Široce akceptovaný obecný koncept představuje ALS jako multifaktoriální onemocnění, charakterizované interakcí mezi genetickou predispozicí a environmentálními faktory, působícími v průběhu života postiženého jedince (Al-Chalabi A. a Hardiman O., 2013; Vasta R. et al., 2022). Tuto hypotézu podporují výsledky studií chronické expozice environmentálním toxinům na transgenních animálních modelech (Bailey JM. et al., 2017), popř. genetických polymorfismů v relevantních detoxikačních enzymech v populaci se zvýšenou expozicí pesticidům (Morahan JM. et al., 2007). S tím, jak se stále rozšiřuje úroveň poznání jednotlivých genů, asociovaných s ALS, přibývá argumentů pro hypotézu kontinuálního spektra efektů genetických variant, rozprostírajícího se od variant, jen mírně zvyšujících riziko rozvoje nemoci, po vysoce penetrantní, kauzální mutace (Al-Chalabi A. et al., 2017; Goutman SA. et al., 2022). Usuzuje se ovšem, že i relativně vysoce penetrantní mutace v kauzálních genech vyžadují interakci s exogenními faktory pro rozvoj onemocnění (Chió A. et al., 2018). Varianty v nízké-rizikových genech pak pravděpodobně, při dostatečně intenzivní expozici exogenním vlivům, pouze facilitují kaskádu neurodegenerativních patofyziologických pochodů v motoneuronech (Vasta R. et al., 2022). Environmentální toxiny, popř. exogenní inzulty poté pravděpodobně analogicky působí jako iniciální spouštěče neurodegenerace, nejspíše na úrovni epigenetických interakcí (Belzil VV. et al., 2016; Brusati A. et al., 2023). Úroveň důkazů pro jednotlivé definované exogenní faktory ovšem není vysoká a epidemiologické studie jsou obecně zatíženy značnou řadou metodologických problémů (Vasta R. et al., 2022). Dalším

signifikantním faktorem (souhlasně s maximem incidence onemocnění v sedmé dekádě životě) představuje stárnutí – obecný primární rizikový faktor všech neurodegenerativních onemocnění (Hou Y. et al., 2019), který lze aplikovat specificky i na ALS, resp. kontinuum ALS-FTD (Henderson RD. et al., 2022). Řada celulárních mechanismů, jejichž dysfunkce je asociována se stárnutím (porucha reparace DNA, porucha regulace RNA metabolismu, epigenetické modifikace/aberrace, porucha proteostázy a autofagických mechanismů, mitochondriální dysfunkce atd.) představuje současně klíčové celulární patofyziologické mechanismy, podílející se na patogenezi ALS (Jagaraj CJ. et al., 2024).

Na úrovni obecného modelu etiopatogeneze byla opakovaně validovaná hypotéza, která postuluje, že interakce mezi genotypem a environmentálními noxami je u sporadických případů ALS šestistupňový proces (Al-Chalabi A. et al., 2014, Chio A. et al., 2018). Tento model dále predikuje, že u pacientů s kauzální mutací v klíčových genech dojde k rozvoji onemocnění dříve, tzn. že je k jeho rozvoji potřeba méně obecných stupňů. Jinými slovy, u těchto pacientů vyžaduje patogeneze onemocnění menší míru expozice environmentálním noxám, resp. vlivu změn, asociovaných se stárnutím. Poněkud konkrétněji si lze představit tyto hypotetické kroky např. jako kumulativní poškození DNA či aberrace epigenetických mechanismů (Armon C., 2018). Koherentní a ucelující definice a specifikace těchto patobiologických kroků ovšem dosud nebyla vypracována (Garton FC. et al., 2021).

### **1.3.1. Genetické faktory**

Genetické pozadí amyotrofické laterální sklerózy je velmi komplexní a stále není v dostatečné míře objasněné (Cooper-Knock J. et al., 2021). Studie heritability (míra vlivu genetických faktorů na riziko rozvoje onemocnění) u mono- a dizygotních dvojčat, resp. na bázi populačních registrů, svědčí pro podíl heritability v rozmezí 43 – 61 % (Al-Chalabi A. et al., 2010; Trabjerg BB. et al., 2020). Kromě variant s typickou monogenní formou dědičnosti se na rozvoji nemoci pravděpodobně podílí varianty s oligo- a polygenní formou dědičnosti (Goutman SA. et al., 2022). Od doby, kdy se předvíce než 30 lety podařilo prokázat asociaci mezi genem *SOD1* a ALS, bylo objeveno více než 30 genů, asociovaných s onemocněním (Ranganathan et al., 2020). V průběhu předchozí dekády pak došlo k exponenciálnímu nárůstu nově definovaných genů, asociovaných s ALS, což mimo jiné umožnila kombinace technik sekvenování nové generace (NGS) a celogenomových asociačních studií (GWAS) (Al-Chalabi A. et al., 2017; Chia R. et al., 2018; Pecoraro V. et al., 2020; van Rheenen W., et al. 2021). Na druhou stranu, varianty, které se těmito velkoobjemovými metodami podaří detekovat, jsou nejčastěji klasifikovány jako nejasného

kauzálního významu (Pecoraro V. et al., 2020; Goutmann SA. et al., 2022). Dle současné úrovně poznání se v evropských populacích na patogenezi u asi 48 % familiárních (fALS) a zároveň až 11 % sporadických případů ALS (sALS) podílí mutace ve šesti hlavních genech (Zhou J. et al., 2017, van Daele SH. et al., 2023). Jedná se o hexanukleotidovou expanzi v genu *C9orf72* a mutace v genech *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *TBKI* a *OPTN*. Varianty v ostatních definovaných genech, asociovaných s ALS, jsou zachyceny u cca 3% pacientů (van Daele SH. et al., 2023). Expanze hexanukleotidové repetice *C9orf72*, objevená v roce 2011, je nejčastější genetickou příčinou u evropských případů fALS (více než 30 %). Průkazná je stejně tak u asi 6 % případů sALS (vanDaele SH. et al., 2023). Dále je pak tato mutace detekována až u 25 % familiárních forem frontotemporální demence a představuje tak jeden z klíčových faktorů, spojujících tyto dvě klickopatologické jednotky. Příznačná pro klinickou manifestaci je opakovaně dokumentována výrazná fenotypová variabilita i v rámci jednotlivých rodin, kdy jednotliví příslušníci mohou prezentovat fenotyp izolované behaviorální varianty FTD, obraz izolované ALS, kombinovaný fenotyp obou jednotek, ale někteří rovněž parkinsonský syndrom, eventuálně fenotyp kortikobazální degenerace (Van Langenhove T. et al., 2012; Giannoccaro MP. et al., 2018; Ratti A. et al., 2022). Jde o příklad efektu tzv. genové pleiotropie, kdy stejná patogenní varianta může u různých nositelů v rámci jedné rodiny vést k odlišným manifestacím (Cooper-Knock J. et al., 2015).

Komplexitu genetického pozadí nemoci dále komplikuje fakt, že jednotlivé geny, resp. rovněž individuální varianty v nich (nejmarkantněji pro *SOD1*), se mezi sebou významně liší svojí penetrancí, která navíc může být věkově vázaná - tzn., že k manifestaci dochází převážně až ve vyšších věkových dekadách (Murphy NA. et al., 2017). Dichotomická klasifikace na „familiární“ (dva a více příslušníků stejné rodiny trpí ALS a zároveň nesou stejnou kauzální genetickou variantu) nebo „sporadické“ formy (ojedinělý výskyt v rámci rodiny) tím pádem může být nepřesná kvůli neúplné penetranci, nebo předčasnému úmrtí (před typickým věkem manifestace ALS) nositele kauzální mutace z předchozí generace. Klíčovou roli poté hraje také faktor velikosti rodin. U rodin o málo členech, ve kterých se onemocnění manifestuje izolovaně u jednoho příslušníka, tento může stále s relativně vysokou pravděpodobností nést kauzální mutaci (Al-Chalabi A. a Lewis CM., 2011). Tuto hypotézu dále podporuje pozorování, kdy každá varianta genu, nalezená u familiárních forem ALS, byla prokázána zároveň u pacientů bez zjevné rodinné anamnézy (Schatunov A. a Al-Chalabi A., 2021). Naopak, u rozsáhlých rodin o mnoho členech je, s ohledem na již zmíněné, relativně vysoké obecné populační celoživotní riziko rozvoje nemoci, reálná

statistická pravděpodobnost, že nezávisle na sobě onemocní dva příslušníci sporadickou formou, bez prokazatelné genetické příčiny (Goutman SA. et al., 2022). Fenotyp, stejně jako neuropatologický nálezn je u familiárních forem velmi často nerozeznatelný od forem sporadických (Shatunov A. a Al-Chalabi A., 2021).

S ohledem na vysokou odhadovanou míru obecné heritability a relativně nízké procento případů, kauzálně podmíněných monogenními variantami, je diskutován tzv. oligogenní model dědičnosti, kdy k rozvoji onemocnění je nutná interakce (dvou a více) rizikových variant v genech, asociovaných s patogenezi ALS (van Blitterswijk M. et al., 2012). Podle recentní, velmi rozsáhlé analýzy (WGS u 6013 sALS pacientů ve srovnání s 2411 kontrolami) je ale kombinace dvou a více variant průkazná u pouze cca. 3% sALS (van Daele SH. et al., 2023).

Dle odhadu rozsáhlé GWAS se polygenní rizika (kombinace vlivu mnoha variant malého efektu) podíl na heritabilitě nemoci z cca. 3,5 % (van Rheenen W. et al., 2016). Jedná se ovšem o intenzivně zkoumanou problematiku a někteří autoři argumentují, že vliv polygenních rizik bude pravděpodobně významně vyšší, než odhadovaný, a to kvůli metodologickým limitacím dosavadních prací; zároveň pak naznačují možná východiska v podobě využití inovativních přístupů (modely nelineární dědičnosti, využití strojového učení, studie interakce genotyp-fenotyp pomocí tzv. Mendeliánské randomizace, aj.) (Cooper-Knock J. et al., 2021).

Zastoupení genetických variant u familiárních a sporadických forem ALS v populaci České republiky dosud nebylo systematicky zkoumáno. Bylo přitom prokázáno, že v různých populacích je zastoupení vzácných variant v genech významně heterogenní a že frekvence genových variant vykazuje značnou geografickou variabilitu (Abecasis GR. et al., 2012).

### **1.3.2. Exogenní faktory**

Kouření cigaret představuje dlouho diskutovaný exogenní faktor, který pravděpodobně mírně zvyšuje riziko nemoci (1,2 – 1,44 x vyšší riziko pro kuřáky proti těm, kteří nikdy nekouřili) (Wang MD. et al., 2017; Wang I. et al., 2011; Peters S. et al., 2020). Detailní mechanismy, kterými kouření facilituje patogenezi onemocnění, nejsou stále uspokojivě objasněny; některé práce hypotetizují ohledně neurotoxického efektu komponent cigaretového kouře jako např. olova a formaldehydu, popř. vlivu inhibice

enzymu paraoxonázy-1 cigaretovým kouřem (Costa LG. et al., 2005; Saeed M. et al., 2006).

Asociace zvýšené expozice těžkým kovům s častějším výskytem onemocnění byla dokumentována několika publikacemi (Wang MD. et al., 2017). Pravděpodobně nejkvalitnější důkazy jsou pro expozici olovem, která byla diskutována jako jeden z možných kauzálních faktorů již od doby prvního popisu ALS v polovině 19. století. Ačkoliv některé metaanalýzy referují rozporuplné výsledky dosavadních studií (Cicero CA. et al., 2017), recentní rozsáhlejší metaanalýza potvrdila vyšší hladiny olova v tělesných tekutinách u pacientů s ALS a obdobná asociace byla prokázána pro selen (Kamalian A. et al., 2023). Kauzálního význam těchto nálezů ovšem nelze zatím spolehlivě určit. Dalším opakovaně diskutovaným environmentálním faktorem je opakovaný kontakt s pesticidy, což prokazují metaanalýzy (Kang H. et al., 2014), resp. cílené komparační studie plazmatických hladin pacientů a kontrol (Goutman SA. et al., 2024). Existují limitované důkazy pro vliv organických rozpouštědel (polychlorované bifenyly) na zvýšení rizika onemocnění (Su FC. et al., 2016), stejně jako pro expozici formaldehydu (Roberts AL. et al., 2016).

Navzdory rozporuplným výsledkům epidemiologických studií ohledně vlivu dyslipidemie (Chelstowska B. et al., 2021; Chió A. et al., 2009) nasvědčují recentní práce signifikantnímu vlivu elevace LDL na zvýšení rizika rozvoje nemoci (Zeng P. a Zhou X., 2019).

Opakovaně zkoumán byl i vliv nadměrně fyzické námahy, obzvláště vzhledem k vyššímu výskytu onemocnění u hráčů fotbalu (Chió A. et al., 2005) a amerického fotbalu (Lehman EJ. et al., 2012). Recentní práce prokazují signifikantní interakci mezi expozicí vysoké zátěži a rizikovými genetickými predispozicemi (Julian TH. et al., 2021; Chapman L. et al., 2023). Definice „nadměrné“ zátěže ale dosud nebyla uspokojivě kvantifikována (Vasta R. et al., 2022). Dalším faktorem, pravděpodobně přidruženým k fyzické zátěži, se jeví být častější výskyt repetitivních cerebrálních a cervikálních traumat u sportovců (Blecher R. et al., 2019).

Dalšími diskutovanými faktory jsou poté např. repetitivní úrazy elektrickým proudem (Wang MD. et al., 2017), popř. vliv expozice cyanotoxinům (Bradley WG. a Mash DC., 2009).

### 1.3.3. Patofyziologie

Predominantním histopatologickým nálezem u 97 % všech (sporadických i familiárních) forem ALS jsou patologické cytoplazmatické inkluze TDP-43 proteinu, současně s jeho průkaznou nukleární deplecí (Prasad A. et al., 2019). Absenci TDP-43 pozitivních inkluzí v histopatologickém nálezem vykazují pouze geneticky podmíněné formy nemoci, způsobené mutacemi v genech *SOD1* a *FUS* (Mackenzie IR. et al., 2007; Kwiatkowski TJ. et al., 2009; Verbeeck C. et al., 2012). U forem nemoci, podmíněných expanzí v *C9orf72*, jsou histopatologické nálezy komplexnější: TDP-43 inkluze představují pouze jeden z atributů, společně s tzv. nukleárními fokusy (nakumulované RNA transkripty repetice  $G_2C_2$ ) a inkluzemi, tvořenými tzv. dipeptidovými repeaty (translační produkt repetice  $G_2C_2$ ) (Gendron TF. et al., 2013). Případy, kauzálně podmíněné mutacemi v *TARDBP*, tedy genu, kódujícímu TDP-43, reprezentují ovšem <1% všech pacientů se sALS (van Daele SH. et al., 2023). Pravděpodobnou hypotézou tedy je, že patologická agregace TDP-43 představuje finální produkt, ke kterému může dospět několik odlišných, předřazených patofyziologických procesů. Významným argumentem pro tuto hypotézu je dokumentovaná asociace TDP-43 proteinopatie s kauzálními mutacemi v řadě odlišných genů, asociovaných s ALS nebo FTD (de Boer EMJ. et al., 2020). Souhrnem tak lze pravděpodobně vnímat roli TDP-43 u převážné většiny forem ALS jako analogii k roli beta-amyloidu u Alzheimerovy nemoci nebo alfa-synucleinu u Parkinsonovy nemoci. Všechny tyto patologické proteiny či peptidy sdílejí obdobné vlastnosti: aberantní uspořádání proteinu, schopnost autoagregace, formování inkluzí s konformací beta-skládaného listu a výsledná cytotoxicita (Kanouchi T. et al., 2012).

Fyziologicky se u TDP-43 jedná o tzv. heterogenní ribonukleoprotein, lokalizovaný predominantně v jaderném kompartmentu, kde vykonává své hlavní funkce: regulaci transkripce mRNA, sestřih pre-mRNA a transport mRNA (Prasad A. et al., 2019). TDP-43 ovlivňuje alternativní sestřih více než 900 různých mRNA produktů (Polymenidou M. et al., 2011). Zároveň se však kontinuálně pohybuje mezi jaderným kompartmentem a cytoplazmou (Ederle H. a Dormann M., 2017), kde se mj. podílí na regulaci formování tzv. stresových granul – přechodných (dynamických) cytoplazmatických nemembránových organel, ve kterých při exogenním buněčném stresu (ischemie, oxidativní stres, tepelný šok, infekce) dochází k selektivnímu potlačení translace non-vitální mRNA (Prasad A. et al., 2019). Je přítomen také v presynaptických zakončeních neuromuskulární junkce ve formě transportních granul obsahujících mRNA, kde se účastní translace vitálních proteinů (Fallini C. et al., 2012). TDP-43 je schopen měnit konformaci mezi solubilním a



agregovaným stavem, a to díky C-terminální „prion-like“ doméně (dle strukturální i funkční podobnosti s prionovými proteiny kvasinek) (Harrison AF. a Shorter J., 2017). V této doméně je zároveň lokalizována převážná většina popsanych mutací genu *TARDBP*, z nichž většina zvyšuje náchylnost TDP-43 k agregaci (Lattante S et al., 2013). Fyziologický význam této domény tkví mimo jiné ve vazbě TDP-43 na stresová granula. Narušení dynamiky stresových granul je velmi pravděpodobně asociováno s tvorbou patologických cytoplazmatických inkluzí TDP-43, jedná se však o velmi komplexní děj, jehož jednotlivé kroky jsou nadále předmětem intenzivní vědecké debaty (Aulas A. a Vande Velde C., 2015; Baradaran-Heravi Y. et al., 2020). Jde velmi pravděpodobně o perspektivní oblast výzkumu celulární patofyziologie, s potenciálem stát se jedním z významných terapeutických cílů (Mann JR. et al., 2019). Výsledným produktem předřazených patofyziologických procesů je významně post-translačně modifikovaný protein TDP-43, který je dále rozštěpen na oligomery s toxickými a autoagregačními vlastnostmi (Fang YS. et al., 2014).

Protein Fused-in-Sarcoma (FUS), vykazuje významnou strukturální a funkční homologii s TDP-43. Rovněž jde o převážně nukleárně lokalizovaný ribonukleoprotein, cirkulující mezi jádrem a cytoplazmou, kde se podílí na formování stresových granulí. Stejně jako u TDP-43 je u něj prominentní prion-like doména s vysokou náchylností k autoagregaci (Ratti A. a Buratti E., 2016). U fALS pacientů s kauzální mutací ve *FUS* genu jsou nalézány intracelulární agregáty tohoto proteinu (Verbeeck C. et al., 2012).

Obecně lze pro TDP-43 proteinopatie i pro formy, podmíněné mutací ve *FUS* konstatovat dva na sobě nezávislé, resp. pravděpodobně vzájemně konvergentní mechanismy. Prvním je mechanismus ztráty funkce, kdy nukleární deplece obou proteinů vede k následné dysregulaci metabolismu RNA (k čemuž dochází i u forem, podmíněných *C9orf72* HRE prostřednictvím nukleárních fokusů). Na druhé straně pak jde o rozvoj toxicity prostřednictvím nesolubilních agregátů a oligomerů. S druhým mechanismem se dále asociují poruchy celulárního systému kontroly kvality proteinů, tedy proteasom-ubikvitinového a autofagického celulárního aparátu. Patogenní mutace v řadě genů, kódujících klíčové proteiny těchto dvou systémů, jsou kauzálně asociované s patogenezi ALS, nebo FTD a výsledným produktem všech těchto forem je TDP-43 proteinopatie. Jde o geny *OPTN*, *SQSTM1*, *TBK1*, *UBQLN2* a *VCP* (Mandrioli J. et al., 2020), přičemž mutace v *OPTN* a *TBK1* jsou s relativně vysokou frekvencí detekovány i u sporadických forem ALS (van Deaele SH. et al., 2023). Dalšími významnými celulárními procesy,

postiženými u TDP-43 proteinopatie, je narušení funkce cytoskeletu a mikrotubulárních transportních mechanismů, mitochondriální dysfunkce a poruchy v mechanismech reparace DNA (de Boer EMJ. et al., 2020).

Mutace v genu *SOD1*, kódujícím enzym superoxiddismutázu-1, vedou převážně k získané toxicitě aberantně uspořádaného proteinu (Lafférière F. a Polymenidou M., 2015); mechanismus ztráty funkce byl dosud asociován pouze s vzácnou infantilní formou nemoci (de Souza PVS. et al., 2021). Jako významné se jeví mechanismy excitotoxicity (Wainger BJ. et al., 2014), stresu endoplazmatického retikula (Kikuchi H. et al., 2006), narušení funkce ubikvitin-proteasomového systému a autofagického aparátu (Bendotti C. et al., 2011) a rovněž poškození mitochondrií (Vande Velde C. et al., 2008). Aberantní formy SOD1 proteinu jsou schopny autoagregace a zároveň se šíří do okolních nepostižených neuronů, kde indukují agregaci dosud solubilního SOD1 (Münch C. et al., 2011).

Aberantní protein TDP-43 je rovněž prokazatelně schopen, indukovat tvorbu agregátů. Výsledky studií na transgenních myších (Porta S. et al., 2018; Ding X. et al., 2021) a rovněž na humánních buněčných kulturách (Smethurst P. et al., 2020) prokázaly, že aplikace patologického TDP-43 (derivovaného z post-mortem tkání pacientů, popř. jeho syntetických fibril) je v těchto modelech schopna navodit agregaci a následně replikovat trans-neuronální propagaci patologického TDP-43 a rozvoj analogického fenotypu, stejně jako histopatologického obrazu, pozorovaných u pacientů. Byly popsány různé subtypy patologických agregátů TDP-43, s různými způsoby propagace napříč mozkovými regiony – což může být podkladem pozorované heterogenity výsledných klinických a histopatologických vzorců postižení (Porta S. et al., 2021). Lze tedy konstatovat relativně kvalitní přímé důkazy pro tzv. „prion-like“ chování patologického TDP-43.

Na makroanatomické úrovni postižení motorického systému se jako relevantní jeví klinické pozorování, že projevy onemocnění se iniciálně téměř vždy manifestují fokálně s posloupnou manifestací v dalších, iniciálně nepostižených regionech podle několika stereotypních vzorců (Ravits JM. et al., 2007). Jedna z hypotéz, pokoušející se objasnit tento fenomén, předpokládá stochastický iniciální inzult v subpopulaci vulnerabilních regionálních motoneuronů (korespondujících s regionem klinické manifestace), odkud se následně patologický proces dále šíří na základě neuroanatomické konektivity (Ravits JM. a La Spada AR., 2009; Wilkinson D. et al., 2009; Kanouchi T. et al., 2012). Tato hypotéza je konzistentní s výše zmiňovanými důkazy pro „prion-like“ šíření TDP-43. Jiní autoři pak postulují hypotézu multifokálního, navzájem nezávislého rozvoje a rovněž (na propagaci

podél neuroanatomické konektivity) nezávislé, následné regionální progresi nemoci (Takeda T. et al., 2020). Kromě opory v modelech „prion-like“ propagace TDP-43 a na základě neuropatologických post-mortem nálezů (Brettscheider J. et al., 2013; Fatima M. et al., 2015) podporují hypotézu iniciálního fokálního inzultu a následné trans-neuronální propagace také poznatky z geneticky podmíněných forem nemoci. Přes ubikvitárně přítomnou genetickou mutaci (postiženy jsou všechny buňky) je dokumentována výrazná fenotypová pleiotropie v rámci jednotlivých rodin, ať už pro nosiče HRE v *C9orf72* (jak již bylo diskutováno v oddílu 1.3.1), tak pro různé mutace v *SOD1* (Talbot K., 2014). Dále pak byl u presymptomatických nosičů mutací v *SOD1* prokázán normální počet činných motorických jednotek, který se signifikantně, abruptně a pouze fokálně snížil několik měsíců před klinickou manifestací (Aggarwal A. a Nicholson G., 2001; Aggarwal A. a Nicholson G., 2002). Data jiných autorů přinášejí poznatky, že iniciální fokus rozvoje onemocnění není stochastický, ale je signifikantně asociovaný (a tedy alespoň parciálně determinovaný) s věkem, pohlavím a přítomností mutací v hlavních genech (*SOD1*, *C9orf72*) (Chió A. et al., 2020). Stejně tak není definitivně uzavřena debata, zda je oním iniciálním fokusem populace kortikálních motoneuronů (tzv. „dying-forward“ hypotéza), odkud se pomocí přímé, monosynaptické konektivity cestou kortikospinální dráhy proces propaguje na spinální  $\alpha$ -motoneurony; nebo alternativně, zda je iniciálním fokusem neuromuskulární junkce, odkud se retrogradně propaguje („dying-back“ hypotéza), popř. zda procesy v kortikálních a spinálních motoneuronech probíhají nezávisle na sobě (Dadon-Nachum M. et al., 2011, Kiernan MC. et al., 2011). Aktuálně spíše převažují argumenty pro „dying forward“ hypotézu (Eisen A., 2021).

V souladu s hypotézou klíčové patogenní role aberantního proteinu TDP-43 pro další progresi napříč motorickým systémem (prion-like šíření, viz výše) poté někteří autoři formulují dvě principiální trajektorie neuroanatomické progresi nemoci (Del Treidici K. a Braak H., 2022): (1) trans-synapticky podél kortikospinálních (resp. kortikobulbárních) drah; (2) per continuitatem – horizontálně (latero-mediálně a poté kontralaterálně) i vertikálně napříč sloupci spinálních  $\alpha$ -motoneuronů (Gromicho M. et al., 2020; Maranzano A. et al., 2023).

Na základě histopatologických nálezů byla formulována hypotéza, že regionální míra („nálož“) akumulace patologických TDP-43 agregátů poté predikuje klinický fenotyp v rámci FTD-MND klinicko-patologického kontinua: v případě nejmasivnějšího postižení předního cingulárního kortexů tento nález s velkou přesností predikuje behaviorální

variantu FTD; v případě nejmasivnějšího postižení jádra nervus hypoglossus pak ALS (Tan R. et al., 2015).

Ačkoliv postižení motorického systému představuje jednoznačně predominantní rys onemocnění, řada důkazů prokazuje subtypy onemocnění s multisystémovým postižením CNS jak na histopatologické, tak i klinicko-syndromologické úrovni (McCluskey L. et al., 2014; Reyes-Leiva D. et al., 2022; Del Treici K. a Braak H., 2022), s manifestací v podobě neuropsychiatrických, dysautonomních, popř. extrapyramidových projevů (Shojaie A. et al., 2024).

## **1.4. Klinická prezentace a diagnostické možnosti**

### **1.4.1. Klinický obraz**

Jak již bylo v předchozích oddílech zmíněno, ALS se nejčastěji manifestuje fokálně vyjádřenými projevy postižení kortikálního motoneuronu (resp. kortikospinální dráhy) v kombinaci s lézí spinálních nebo bulbárních  $\alpha$ -motoneuronů a tyto projevy – se značně variabilní dynamikou – dále progredují v čase do dalších regionů. Jednotlivé regiony jsou definovány jako bulbární, cervikální, torakální a lumbosakrální (Brooks BR. et al., 2000). Symptomy progredují jednak v rámci regionu ve smyslu šíření do přilehlých míšních segmentů (např. z ruky na předloktí a paži ipsilaterální horní končetiny), jednak do vzdálených regionů podél trajektorie kortikospinálních drah (např. progresse z horní končetiny na ipsilaterální dolní končetinu - viz také oddíl 1.3.3). Není bez zajímavosti, že motoneurony okulomotorických jader a v Onufově spinálním jádru vykazují značnou rezistenci vůči postižení patogenním procesem a tím pádem nebývá oslabení okulomotorických svalů, resp. sfinkterů vyjádřeno vůbec, nebo až v nejpokročilejších formách nemoci (Eisen A. et al., 2017; Carvalho M. et al., 1995). V závislosti na přítomnosti a rozsahu postižení kortikálních nebo spinálních (bulbárních)  $\alpha$ -motoneuronů lze definovat několik klinických variant ALS, které se odlišují jednak prognózou délky přežití, jednak odlišnou akcentací symptomů a tím pádem odlišným těžištěm symptomově orientované péče (Izenberg A., 2023). Tato heterogenita klinických prezentací a rovněž odlišná rychlost progresse ovšem komplikuje včasnou správnou diagnózu a klade vysoké nároky na adekvátní diferenciálně diagnostický proces, protože krom sériového klinického, resp. EMG vyšetření (k detekci subklinického stupně postižení spinálních nebo bulbárních  $\alpha$ -motoneuronů) není k dispozici žádný, samostatně dostatečně spolehlivý diagnostický test jakožto „zlatý standard“ (Turner MR., 2022). Volba vhodných diagnostických testů

k exkluzi alternativních diagnóz se tak odvíjí od regionu prezentace a vyjádřeného postižení kortikálního a/nebo spinálního motoneuronu (viz dále).

Klasická forma ALS se prezentuje kombinací amyotrofie (denervační atrofie a svalová slabost) a laterální sklerózy (degenerace kortikospinálního traktu v laterálních sloupcích míchy), mezi jejíž projevy patří hyperreflexie, deliberace primitivních reflexů, narušená koordinace vysoce specifických pohybových vzorců, resp. spasticita (Tab. 1). Jde o nejčastější formu nemoci, postihující asi 55-60 % pacientů s ALS (Marin B. et al., 2016; Rosenbohm A. et al., 2017). Nástup onemocnění je zprvu nenápadný, nejčastěji na distální části končetiny, např. v podobě nevysvětlitelného zakopávání (diskrétní, parciálně kompenzovaná peroneální stepáž) nebo obtíží v jemně-motorických úkonech (psaní, zapínání knoflíků atd.). Tyto projevy jsou zpravidla nebolestivé, ačkoliv postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu může vést k nepříjemným, až bolestivým svalovým krampi (Izenberg A., 2023). Časným projevem, předcházejícím často rozvoj amyotrofie, jsou fascikulace, převážně generalizované a difuzní (Eisen A. et al., 2017). Důležitým znakem je absence somatosenzitivního deficitu v příslušných dermatomech. V rámci diferenciální diagnostiky je nejdůležitější, odlišit pomocí MRI spondylogenní cervikální myelopatii jakožto léčebně ovlivnitelnou jednotku, která má navíc obdobný věkový vrchol incidence, jako ALS (Cellura E. et al., 2012). Následuje různě rychlá progresse deficitů na přilehlé svaly příslušné končetiny a poté buď na ipsilaterální, nebo kontralaterální končetiny. Často je výsledkem obraz generalizovaných, ale značně asymetricky vyjádřených deficitů, finálně i s postižením ventilačních svalů. Asi polovina pacientů umírá do 2-3 let od prvních projevů, do 5 let pak zemře 80-90 % pacientů (Chió A. et al., 2011). Fokus rozvoje může být i v bulbárním regionu. Zde se manifestuje nejčastěji dysartrií a spíše postupně se rozvine i dysfagie. Při detailním iničiálním vyšetření nebo záhy při následných kontrolách je ale průkazné diskrétní postižení i ostatních regionů. Přítomnost bulbárního postižení představuje obecný nepříznivý prognostický faktor (Marin B. et al., 2016; Chió A. et al., 2009). Dalšími signifikantními prediktory jsou věk při nástupu onemocnění (starší věk je nepříznivý prediktor) a rychlost progresse, kalkulovaná jako rychlost ztráty funkčních dovedností pomocí klinimetrické škály ALSFRS-R (anamnestická, 12-položková škála hodnocení funkčních dovedností u ALS; viz sekce 11. Přílohy) (Westeneng HJ. et al., 2018). Příčinou úmrtí je nejčastěji respirační selhání (Chió A. et al. 2009).

Fenotyp s izolovanou atrofií a oslabením svalů bez klinicky manifestních projevů léze kortikospinálního traktu je označován jako progresivní svalová atrofie (PMA). Jde o

pomaleji progredující formu, 45 % pacientů přežívá déle než 5 let (Visser J. et al., 2007). Přes absenci spasticity a hyperreflexie lze i u této formy neuropatologicky prokázat degeneraci kortikospinálního traktu (Riku Y. et al., 2014). Zároveň jsou u některých pacientů se sporadickou formou PMA nalézány patogenní mutace v genech, kauzálně asociovaných s patogenezí ALS (van Blitterswijk M. et al., 2017). U familiárních forem je dokumentováno, že stejná patogenní mutace se u některých postižených ze stejné rodiny prezentuje jako ALS, u jiných jako PMA (Swinnen B. a Robberecht W., 2014). PMA je důležité odlišit od jednotek, které mohou probíhat pod velmi podobným klinickým obrazem. V první řadě jde o léčebně ovlivnitelnou, dysimunitně podmíněnou multifokální motorickou neuropatii (pomocí EMG, resp. kondukčních elektrofyzilogických studií) (Traynor BJ. et al., 2000), resp. geneticky podmíněnou, autozomálně recesivní spinální muskulární atrofii s pozdním nástupem – SMA typ 4 (odliší molekulárně genetické vyšetření homozygotní delece 7. a 8. exonu v genu *SMN1*). Dalšími relevantními jednotkami jsou geneticky podmíněná, X-vázaná spino-bulbární muskulární atrofie (Kennedyho nemoc, odliší mol.genetické vyšetření CAG repetice v *AR* genu) (Traynor BJ. et al., 2000) nebo myozitida s inkluzními tělisky (odlišení svalovou biopsií) (Kiernan MC. et al., 2011). Vzácně může po určité době pod obrazem izolované poruchy spinálního a-motoneuronu probíhat i forma GM2 gangliosidózy (Tay-Sachsova choroba) s pozdním nástupem (odliší mol.genetické vyš. genu *HEXA* A).

Je-li výskyt svalové slabosti a atrofie, popř. projevů spasticity omezen po dobu několika let na oblast bulbárních svalů (svaly jazyka, hltanu, hrtanu, čelisti a obličej), hovoříme o progresivní bulbární obrně nebo progresivní bulbární atrofii (PBA). Artikulační dysfunkce je obvykle podmíněna kombinací chabé (hypernazalita) a spastické parézy (monotónnost, výrazné zpomalení). Porucha polykání je dána kombinací narušeného orálního zpracování (usazování potravy mezi tváří a zuby, obtížná pasáž do faryngu) a laryngální aspirace s epizodami kašle a dušení. Někdy může v počátečních fázích dominovat spasticita bulbárních svalů bez atrofie a v těchto případech bývají často vyjádřeny projevy tzv. pseudobulbárního afektu (patologický smích a pláč). Další progresse vede ke kompletní afázii, selhání obranného kašle a respirační insuficienci, jako u klasické formy ALS.

U malé podskupiny (2-4 %) pacientů (Rosenbohm A. et al., 2017; Chió A. et al., 2011) nalézáme pouze projevy kortikospinální léze se spasticitou a hyperreflexií, přičemž atrofie se projevuje až s odstupem řady let, nebo vůbec. Takový fenotyp označujeme jako primární laterální skleróza (PLS). Definitivní diagnózu této varianty lze určit až po 4 letech trvání,

neboť projevy postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu se u klasické ALS mohou manifestovat až s odstupem 3 let (Gordon PH. et al., 2006). Pacienti s PLS si dlouho uchovávají schopnost chůze s kompenzační pomůckou, ovšem s frekventními pády; postupně se přidává spasticita horních končetin a po několika letech trvání i spastická dysartrie a pseudobulbární paralýza. Přežití je nejdelší ze všech podtypů, až 70 % pacientů přežívá více než 10 let (Chió A. et al., 2011). Diferenciálně diagnosticky důležité je odlišit hereditární spastickou paraplegii, která má velmi podobný klinický obraz. U této jednotky jsou typicky postižení další přírodní příbuzní, progresse je pomalejší a míra postižení horních končetin, resp. výskyt pseudobulbární léze jsou méně vyjádřeny, ačkoliv i u této jednotky je popsána značná variabilita fenotypů (Lo Giudice T. et al., 2014). Prominentní postižení kortikospinální dráhy je také rysem např. primárně progresivní sclerosis multiplex, nebo subakutní kombinované degenerace v důsledku hypovitaminózy B12. Tyto jednotky ale zpravidla mají charakteristický nález na MRI míchy a klinicky vyjádřené somatosenzitivní deficit (Izenberg A., 2023; van Es MA. et al., 2017).

Často jsou s ALS rovněž asociované kognitivní symptomy: u 5-15 % je plně vyjádřená FTD a až 50 % vykazuje kognitivní nebo behaviorální poruchy ze spektra fronto-temporálních symptomů (Strong MJ. et al., 2017). Z behaviorálních symptomů je nejčastější apatie a ztráta sympatie, nebo empatie (Abrahams S. et al., 2014). Z kognitivních poruch je nejčastější snížená verbální fluence, porucha fatických funkcí, sociální kognice a exekutivních funkcí (Strong MJ. et al., 2017) (Tab. 2). Pacienti, kognitivně intaktní v čase diagnózy, pravděpodobně kognitivní deficit v dalším průběhu onemocnění nerozvinou; naopak exekutivní dysfunkce, detekovaná v čase diagnózy, v dalším průběhu onemocnění progreduje a je asociována s obecně rychlejší progresí všech dalších projevů, resp. horší prognózou (Elamin M. et al., 2013). Kognitivní poruchy se zároveň významně častěji vyskytují u forem, podmíněných mutacemi v relevantních genech (typicky *C9orf72*) (Chió A. et al., 2012). Kognitivní a behaviorální porucha významně zhoršuje adherenci k navrženým terapeutickým intervencím a zvyšuje zátěž pečujících osob (Hu WT. et al., 2013).

#### **1.4.2. Diagnostická kritéria**

Diagnóza je stanovena nadále na základě klinického nálezu, resp. podepřená výsledky elektrofyziologického vyšetření (kondukční studie, vyšetření jehlovou EMG) a zároveň výsledky adekvátně zvolených diagnostických testů k exkluzi potenciálních alternativních diagnóz (Turner MR., 2022). Diagnostická kritéria byla za posledních 30 let opakovaně

revidována (El-Escorial kritéria 1990, revidovaná El-Escorial kritéria z roku 1998, Awaji kritéria 2006, návrh revize pracovní skupiny World Federation of Neurological societies z roku 2015) (Timmins HC. et al., 2024). Veškerá předchozí kritéria pracovala se systémem úrovně diagnostické jistoty (suspektní, možná, pravděpodobná a definitivní) podle počtu etází, postižených současně projevy léze kortikálního a spinálního (bulbárního) motoneuronu. Recentní návrh diagnostických kritérií z roku 2020, tzv. Gold Coast kritéria, tento proces poněkud zjednodušuje odstraněním úrovní diagnostické jistoty (Tab. 1); zároveň bylo prokázáno, že tato kritéria dosahují lepší senzitivitu a specificitu pro variantní formy ALS oproti předchozím kritériím (Hannaford A. et al., 2021).

Průměrná diagnostická prodleva činí 12 měsíců od prvních příznaků nemoci (Richards D. et al. 2020). Tento ukazatel významně variuje napříč různými státy, resp. zdravotními systémy (Galvin M. et al., 2017; Paganoni S. et al., 2014; Turner MR. et al., 2010). Úskalí diagnostického procesu dokumentuje četnost chybně stanovené diagnózy v iniciální fázi nemoci, která bývá uváděna mezi 30 až 60 % (Richards D. et al., 2020). Až u 13 % pacientů tato chybně stanovená diagnóza vede k nesprávně indikovaným operačním výkonům, bez jakéhokoliv benefitu (Srinivasan J et al., 2006), resp. s rizikem akcelerace nemoci (Pinto S. et al., 2014), popř. k aplikaci nákladných a potenciálně rizikových léčiv, bez reálné šance na jakýkoliv benefit (Simon NG. et al., 2013). Tento aspekt diagnostické nejistoty tedy v důsledku výše zmíněných faktorů představuje zátěž jednak pro zdravotní systém (řada nesprávně indikovaných testů, popř. intervencí) (Galvin M. et al., 2017) stejně jako pro pacienta, popř. jeho rodinu v podobně psychosociálního stresu z nejistoty (Paganoni S. et al., 2014).



**Tab. 1** Gold Coast diagnostická kritéria (upraveno dle Turner MR., 2022)

<b>Progredující motorický deficit</b> , dokumentovaný anamnesticky nebo opakovaným objektivním neurologickým vyšetřením
<u>A zároveň</u>
Postižení kortikálního <sup>1</sup> a spinálního <sup>2</sup> (bulbárního) motoneuronu v <b>minimálně jednom definovaném tělesném regionu<sup>3</sup> současně</b> ; nebo postižení pouze spinálního (bulbárního) motoneuronu v <b>minimálně dvou definovaných regionech</b>
<u>A zároveň</u>
Adekvátně zvolené diagnostické testy <sup>4</sup> vyloučily relevantní alternativní diagnózy

1 – (minimálně 1 vyjádřen): hyperreflexie / normoreflexie u atrofovaných a oslabených svalů; deliberace primitivních reflexů nebo pyramidové iritační jevy; spasticita; zpomalení/ dyskoordinace pohybů

2 –objektivní klinický nález atrofie a oslabení/nebo EMG abnormality (průkaz chronické neurogenní léze v kombinaci s aktivním denervačním syndromem: fibrilace, ostré vlny a/nebo fascikulační potenciály)

3 – bulbární, cervikální, torakální a lumbosakrální; postižení (klinické / EMG) cervikálního a lumbosakrálního spinálního motoneuronu **minimálně ve dvou svalech**, inervovaných odlišnými radixy; postižení bulbárního motoneuronu a torakálního spinálního motoneuronu **minim. v jednom svalu**

4 –volba diagnostických testů závisí na klinické prezentaci (viz jednotlivé pasáže v textu 1.4.1)

**Tab. 2** Diagnostická kritéria ALS-FTD (upraveno dle Strong MJ. et al., 2017)

<b>Progredující změny chování a/nebo kognice</b> u pacienta s diagnózou ALS
<u>A zároveň</u>
<b>Minimálně tři symptomy behaviorální<sup>1</sup> a/nebo kognitivní poruchy<sup>2</sup></b>
<u>Nebo</u>
<b>Dva symptomy behaviorální/kognitivní poruchy a ztráta náhledu a/nebo psychotické projevy</b>
<u>Nebo</u>
<b>Porucha řeči</b> , naplňující kritéria sémantické demence/non-fluentní primárně progresivní afázie

1 – a) behaviorální dezinhibice b) apatie c) ztráta sympatie/empatie d) perseverace, stereotypie, kompulzivní chování e) hyperoralita a změna stravovacích návyků

2 – exekutivní dysfunkce (verbální fluence, pozornost, abstrakce/konceptualizace, inhibice); sociální kognice; poruchy řeči – pojmenování, porozumění, gramatika

### 1.4.3. Biomarkery

Biomarker lze obecně definovat jako objektivní, kvantifikovatelný produkt určitého biologického procesu, který lze detekovat a měřit *in vivo* (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Obecně lze biomarkery dělit podle jejich primárního účelu na diagnostické a prognostické, resp. farmakodynamické markery (markery terapeutické odpovědi). Na základě vyšetřované modality lze poté v rámci ALS-FTD vymezit biomarkery, detekované z tělesných tekutin pacientů – tzn. biochemické, zobrazovací a dále pak neurofyziologické markery. Pro biochemické markery je dále důležitou perspektivou, zda se jedná o produkty, asociované se specifickou patofyziologií onemocnění, nebo o nespecifické vedlejší jevy, průkazné u řady jiných patologických stavů.

#### 1.4.3.1. Biochemické markery

Dosud jediný etablovaný a rozšířený biochemický marker s diagnostickým i prognostickým významem pro ALS představují lehké (NfL) a fosforylované těžké (p-NfH) řetězce neurofilament, jak prokazuje řada studií (Dreger M. et al., 2021; Halbgebauer S. et al., 2022) i výsledky zcela recentní metaanalýzy (Shahim P. et al., 2024). Jedná se o cytoskeletální proteiny, exprimované v silných, myelinizovaných axonech, které se v případě axonálního poškození uvolňují do extracelulárního prostoru a následně do likvoru. Jde o tudíž o nespecifický biomarker, asociovaný s obecným procesem axonální léze, který nereflektuje subtypy poškozené neuronální subpopulace, ani neuroanatomickou oblast léze (Witzel S. et al., 2022). Zvýšené hladiny neurofilament v likvoru i v krvi jsou prokazovány u řady dalších patologií CNS (traumata, komprese, ostatní neurodegenerativní nebo zánětlivá onemocnění) (Bridel C. et al., 2019; Kušnierová P. et al., 2019), což významně ovlivňuje jejich diskriminační schopnost v závislosti na typu patologie, od které mají ALS odlišit. Zároveň hladina neurofilament průkazně signifikantně narůstá s věkem i u zdravých jedinců (Khalil M. et al., 2020). Hladina NfL v likvoru signifikantně pozitivně koreluje s rychlostí progresu ALS, tzn. jinými slovy s agresivitou onemocnění (Dreger M. et al., 2021). Ačkoliv multimodální korelace s nálezy v zobrazovacích vyšetřeních (Schreiber S. et al., 2018), resp. při srovnání klinických variant (Gaiani A. et al., 2018) nasvědčují, že míra postižení kortikospinálních drah je jednou z důležitých determinant zvýšené hladiny NfL v likvoru, varianty onemocnění s predominantním postižením kortikospinální dráhy vykazují zároveň nejpomalejší progresi. Tento paradox dokumentuje nutnost komplexního přístupu ke správné predikci prognózy, tzn. nutnost, hodnotit jednotlivé parametry (hladina neurofilament, klinický fenotyp) v celkovém kontextu všech nálezů (Dreger M. et al., 2022). Ačkoliv hladina

neurofilament v likvoru lépe odráží patofyziologii onemocnění, z pohledu longitudinálního hodnocení je limitujícím aspektem invazivita jeho opakovaného odběru. Hladiny p-NfH i NfL v séru (Huang F. et al., 2020; Benatar M. et al., 2018) vykazují stabilní hladiny v čase a jeví se jako vhodný biomarker terapeutické odpovědi, což dokládají i některé recentní intervenční klinické studie (Dorst J. et al., 2020).

S ohledem na jeho klíčovou roli v patofyziologii onemocnění představuje detekce aberatního proteinu TDP-43 hypoteticky ideální, pro onemocnění vysoce specifický diagnostický marker. Dosavadní snahy o *in vivo* detekci a zároveň kvantifikaci patologické formy proteinu pomocí cílených protilátek a následná schopnost diskriminace mezi skutečně nemocnými a alternativními diagnózami ovšem dosud vedla k nejednoznačným a rozporuplným výsledkům (Cordts I. et al., 2023). Jedním z klíčových důvodů je pravděpodobně nespecifická vazebná afinita dosud vyvinutých protilátek, které tak detekují převážně fyziologickou formu proteinu TDP-43 (Steinacker P. et al., 2008; Feneberg E. et al., 2018). Tento ubikvitárně exprimovaný protein cirkuluje volně mezi krví a likvorem a hladina TDP-43 v likvoru, detekovaná pomocí dosud vyvinutých protilátek, tak velmi pravděpodobně nereflektuje patofyziologii onemocnění (Feneberg E. et al., 2014). Recentní publikace se proto zaměřily na jiné, než protilátkově zprostředkované metody detekce a kvantifikace patologického TDP-43, jmenovitě jde o metodu RT-QuIC (real-time quacking induced conversion), která je schopna kvantifikovat agregáty TDP-43 v likvoru (Scialo` C. et al., 2020). Další práce uvádějí slibné výsledky techniky měření absorbance infračerveného spektra patologické formy TDP-43 (separované metodou imunoextrakce z likvoru pacientů) (Beyer L. et al., 2021). Žádná z těchto metod ovšem dosud nebyla nezávisle replikována. V současné době tedy stále není k dispozici úspěšná, validovaná metoda detekce patologické formy TDP-43 (Cordts I. et al., 2023).

Pro formy nemoci, podmíněné mutacemi v *SOD1* genu se – s ohledem na přímou patogenní roli aberatního proteinu – jeví jako cílový specifický marker terapeutické odpovědi jak hladina jeho mRNA, tak i hladina samotného SOD1 proteinu. Oba tyto markery byly využity v terapeutické studii s antisense-oligonukleotidovým preparátem (tofersen), navozujícím degradaci mRNA a následně redukcí syntézu SOD1 proteinu; tato studie prokázala signifikantní a na dávce preparátu závislý pokles hladiny obou markerů (Miller T. et al., 2020). Analogickým diagnostickým a terapeutickým markerem pro formy, podmíněné HRE v genu *C9orf72*, je nově vyvinutá metoda detekce tzv.

proteinů s dipeptidovými repeticemi (translační produkt patogenní expanze) (Wilson KM. et al., 2022).

#### *1.4.3.2. Zobrazovací vyšetření*

Rutinní MRI má význam pouze k odlišení alternativních diagnóz; s ohledem na absenci signálových změn v T2 sekvencích, resp. atrofie v T1 sekvencích ale tuto metodu nelze využít jako diagnostický biomarker nemoci (Reyes-Leiva D. et al., 2022). Naopak metody kvantitativního MRI, jako např. voxel-based morfometrie, jsou schopny detekovat signifikantní regionální atrofii cerebrálního kortexu (precentrální a centrální gyrus, přední cingulární gyrus) u pacientů s ALS ve srovnání s kontrolami (Shen D. et al., 2016). Morfometrie kortexu ale nemusí být dostatečně senzitivní v iniciálních fázích onemocnění (van der Burgh HK. et al., 2020). Jako senzitivnější technika, hodnotící mikrostrukturální patologii bílé hmoty i kortexu, se jeví DTI (diffuse-tensor imaging), založená na rozdílné prostorové difuzi molekul vody (Illán-Gala I. et al., 2020). Klinický význam funkční MRI, popř. MR spektroskopie je zatím nejasný (Reyes-Leiva D. et al., 2022).

Další zkoumanou zobrazovací metodou je pozitronová emisní tomografie (PET), nejčastěji s využitím radioaktivní <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglukózy. Tato metoda je schopná prokázat hypometabolismus frontálních i prefrontálních oblastí u pacientů s ALS a současnou kognitivní či behaviorální poruchou (Canosa A. et al., 2020), ale rovněž symetrický hypometabolismus prefrontálního, premotorického a inferolaterálního parietálního kortexu u pacientů s ALS bez kognitivního deficitu (Van Weehaeghe D. et al., 2016). Tato metoda ale dosud nebyla dostatečně validována jako diagnostický marker nezávislými studiemi (Agosta F. et al., 2018). Hypoteticky optimálním diagnostickým markerem by se jevilo využití PET v kombinaci s ligandem, afinitním k fosforylovanému TDP-43. Tato metoda ale dosud nebyla vyvinuta (Brooks DJ. et al., 2021).

#### *1.4.3.3. Neurofyziologické biomarkery*

Techniky, využívající transkraniální magnetickou stimulaci v kombinaci se specifickými testovacími protokoly, prokazují kortikální hyperexcitabilitu jako časný projev postižení motorického kortexu u ALS (Vucic S. a Kiernan MC., 2006). Nezávislé studie prokazují relativně dobrou senzitivitu i specificitu této techniky jako diagnostického markeru (Menon P. et al., 2015) a zároveň pozitivní korelaci s další progresí onemocnění (Menon P. et al., 2020).

Kvantitativní elektrofyziologická metoda MUNIX (Motor Unit Number Index – index počtu motorických jednotek) využívá běžné vybavení pro vyšetření motorických kondukčních studií v kombinaci se speciálním softwarem. Tento index představuje odhad míry ztráty spinálních motoneuronů a dokáže detekovat jejich signifikantní pokles ještě před rozvojem klinicky manifestního oslabení příslušného svalu (Neuwirth C. et al., 2017). Jeví se jako perspektivní prognostický a potenciálně i farmakodynamický biomarker (Ebersbach T. et al., 2022).

### **1.5. Management**

Jedinou obecně schválenou farmakoterapií s dostatečnou úrovní důkazu stran mírného zpomalení progresu pro všechny formy onemocnění zůstává nadále pouze preparát riluzol (Van Damme P. et al., 2024). Od roku 2024 byla Evropskou lékovou agenturou schválena pro formy onemocnění, podmíněné mutacemi v *SOD1*, léčba intratekálně aplikovaným preparátem tofersen (antisense oligonukleotid, blokující translaci mRNA *SOD1* a tím pádem tvorbu SOD1 proteinu). Několik dalších preparátů je ve stádiu klinických studií fáze III a očekávají se jejich výsledky (Van Damme P. et al., 2024).

Hlavním těžištěm péče o pacienty s ALS je proto symptomově orientovaná terapie, jejichž hlavními strategickými cíli je udržování autonomie a důraz na zlepšování kvality života (Andersen PM. et al., 2012). Nejrobustnější důkazy stran signifikantního zvýšení kvality života, ale i jeho prodloužení, vykazuje non-invazivní ventilační léčba pozitivním přetlakem (NIV) zahájená včas ve fázi počínající respirační insuficience (Berlowitz DJ. et al., 2016). Klíčový je tak pravidelný monitoring anamnestických projevů rozvíjející se respirační insuficience, stejně jako sériová objektivizace usilovné výdechové plicní kapacity (Andersen PM. et al., 2012). V případě selhávajícího perorálního příjmu potravy a tekutin je nejčastěji doporučovanou metodou k zajištění enterální alimentace tzv. perkutánní gastrostomie. Důkazy pro signifikantní zvýšení kvality života pro tuto intervenci ale dosud chybí (Heffernan C. et al., 2006).

Průběh onemocnění je asociován s výskytem řady dalších symptomů (primárně souvisejících s progredujícím svalovým oslabením, jako spasticita, svalové krampi, porucha řeči a polykání slin s následnou sialorrhoeou; nebo sekundárně přidružených, jako deprese, úzkost, bolest, porucha spánku atd.), které významně snižují kvalitu života, avšak jsou ovlivnitelné řadou farmakologických i nefarmakologických intervencí (Nicholson K. et al., 2018). Obecně preferovanou a doporučovanou formou zajištění poskytované péče

je tzv. multidisciplinární model péče (Hogden A. et al., 2017). Součástí multidisciplinárního týmu by měl být neurolog, pneumolog, logoped, fyzioterapeut, ergoterapeut, psycholog, nutricionista, sociální pracovník a lékař paliativního týmu (Van Damme P. et al., 2024). Tento model péče vede ke zvýšení kvality života nemocných (de Almeida FEO. et al., 2021), včasné a také častější implementaci klíčových intervencí (NIV) (Paipa AJ. et al., 2019) a zároveň k prevenci akutních hospitalizací (Chió A. et al., 2006). Zároveň zajišťuje návaznost na paliativní péči včetně včasného plánování postupů v terminálních fázích nemoci (Hogden A. et al., 2017).

## 2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cílem naší práce je jednak upozornit na možnosti a zároveň na úskalí diagnostického procesu, hlavně u atypických variant ALS, nebo (časných) forem s inkompletně vyjádřenými projevy; jednak realizovat pilotní analýzu profilu genetických variant, zastoupených v české populaci, protože tato data dosud nejsou k dispozici. Prvním cílem je tak kriticky zhodnotit možnost implementace vyšetřování likvorových a sérových biomarkerů k usnadnění diagnózy, resp. zhodnotit i jejich prognostický význam; dalším cílem je poskytnout odhad frekvence variant v genech, asociovaných s onemocněním a definovat možné klinické ukazatele jako prediktory vyšší pravděpodobnosti detekce kauzálních mutací. Zároveň je pak výsledným cílem zavedení obou těchto metodik – vyšetřování biomarkerů a rovněž molekulárně genetického vyšetření – do klinické praxe specializovaných center.

### 2.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS

Chybná diagnóza je v iniciálních stádiích onemocnění relativně častá. Spinální forma ALS je často zaměňována s kompresivní radikulopatií nebo myelopatií, mimo jiné i proto, že obě jednotky mají nejvyšší incidenci výskytu ve stejných věkových skupinách, jako ALS (Cellura E. et al., 2012). Důsledkem je skutečnost, že asi 13 % pacientů s ALS podstoupí nesprávně indikovanou chirurgickou léčbu bez perspektivy jakéhokoliv benefitu (Srinivasan J. et al., 2006), resp. s rizikem akcelerace další progresy deficitů v rámci ALS (Pinto S. et al., 2014). V případě, že je klinická prezentace omezena na symptomy postižení pouze spinálních  $\alpha$ -motoneuronů, je nutno diferenciatně diagnosticky zvažovat širokou řadu potenciálních alternativních etiologií, což značně komplikuje diagnostický proces (Sanderson AB. et al., 2015). Výsledkem diagnostické nejistoty může být také aplikace nákladných a potenciálně rizikových léčiv, bez perspektivy reálného benefitu pro pacienty s ALS (Simon NG. et al., 2013). Spolehlivý, validovaný a relativně jednoduše dostupný diagnostický biomarker ALS by tedy významně usnadnil správnou a včasnou diagnózu onemocnění. Za poslední dvě dekády byla řadou studií opakovaně prokázána signifikantní elevace lehkých (NfL) a fosforylovaných těžkých řetězců (p-NfH) neurofilament v likvoru i v krvi u pacientů s ALS a byla zkoumána i role neurofilament jako diagnostického, prognostického ale i farmakodynamického biomarkeru (Poesen K. a Van Damme P., 2019). Elevace hladin neurofilament je ovšem nezávislá na etiopatogenezi axonálního poškození, jak dokladuje řada publikovaných studií, prokazujících elevaci jejich hladin u řady dalších etiologií, vedoucích k postižení nervového systému (Bridel C.

et al., 2019; Kušnierová P. et al., 2019; Rossi D. et al., 2018), mimo jiné i u kompresivních myelo- a/nebo radikulopatií (Ohya J. et al., 2015). Zároveň některé studie referují významně nižší hladinu neurofilament u variant ALS s postižením, omezeným pouze na spinální  $\alpha$ -motoneurony (Gaiani A. et al., 2017). Dosavadní studie, zkoumající diagnostický přínos elevované hladiny neurofilament, se ale systematicky nezabývaly jejich diskriminační schopností v situaci, kdy je žádoucí odlišení od kompresivních myelo-/radikulopatií a stejně tak nebyla dosud systematicky zkoumána jejich diskriminační schopnost u případů s postižením, omezeným na spinální  $\alpha$ -motoneurony. Hypotéza: hladiny NfL v likvoru a p-NfH v likvoru i v séru lze využít jako diagnostický biomarker i v případě odlišení ALS od kompresivních myelo-/radikulopatií a k odlišení forem nemoci a s postižením, limitovaným na spinální  $\alpha$ -motoneurony, od klinicky relevantních alternativních jednotek. Hlavními cíli práce bylo ověřit, zda diskriminační schopnost elevace hladiny neurofilament lze použít jako dostatečně spolehlivý diagnostický nástroj k odlišení klinicky obtížně diferencovatelných jednotek. Vedlejšími cíli bylo zhodnotit prognostický přínos elevované hladiny neurofilament a zároveň zhodnotit hlavní faktory, které determinují, popř. zásadně ovlivňují míru elevace hladin neurofilament v tělesných tekutinách.

## 2.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS

Variety v relevantních genech jsou jedním z klíčových prokázaných etiologických faktorů rozvoje onemocnění. V současné době je definováno více než 30 genů, jejichž patogenní mutace jsou kauzálně asociovány s rozvojem onemocnění podle pravidel Mendelovské dědičnosti (nejčastěji s autozomálně dominantní dědičností) (Cooper-Knock J. et al., 2021). Ačkoliv je familiární výskyt nemoci referován pouze u 5–10 % případů (Shatunov A. a Al-Chalabi A., 2021), u dalších 11% pacientů bez rodinné anamnézy jsou prokazovány mutace v identických genech, jako u familiárních forem (Van Daele SH. et al., 2023). Klinická prezentace familiárních a sporadických forem je často vzájemně neodlišitelná. Nejčastější mutací v evropských populacích je expanze repetice GGGGCC ( $G_4C_2$ ) v prvním intronu genu *C9orf72*, kterou lze prokázat u cca. 34 % familiárních a až 6% sporadických případů. Mezi jednotlivými evropskými etniky byla ovšem referována relativně výrazná variabilita ve frekvenci zastoupení této mutace (Zou ZY. et al., 2017). Mezi dalšími geny, ve kterých jsou nalézány mutace u familiárních, ale i sporadických forem ALS, patří geny *FUS*, *SOD1*, *TARDBP*, resp. relativně recentně objevený gen *TBKI* (Cirulli ET. et al., 2015). Ačkoliv již byla publikována robustní data stran skladby a zastoupení jednotlivých mutací u fALS i sALS pacientů z různých evropských populací,



tato data pocházejí z etnik s odlišným genetickým původem ve srovnání s populací České republiky (Němci, Holanďané, Italové, Portugalci, Maďaři etc.) (Müller K. et al., 2018; Van Daele SH. et al., 2023; Gromicho M. et al., 2018, Tripolszki K. et al., 2019). Dosud byla publikována pouze jedna systematická studie z populace s predominantně slovanským etnikem (Vrabec K. et al., 2015), ve které navíc bylo zkoumáno zastoupení pouze čtyř hlavních genů, asociovaných s ALS. Bylo přitom prokázáno, že v různých populacích je zastoupení vzácných variant v genech významně heterogenní a že frekvence genových variant vykazuje značnou geografickou variabilitu (Abecasis GR. et al., 2012). Hypotéza: genetická skladba kauzálních mutací v genech, asociovaných s ALS, může být v populaci České republiky specifická co do frekvence výskytu HRE v C9orf72 a rovněž vzácných variant v dalších relevantních genech. Cílem naší práce bylo zmapovat frekvenci zastoupení jednotlivých variant v detailně popsané kohortě pacientů s familiární i sporadickou formou ALS a zároveň definovat klinické ukazatele, které by mohly napomoci predikovat nosiče kauzální mutace. S ohledem na rychlý vývoj na poli terapií, specificky cílených na kauzální mutace v jednotlivých genech, se jedná o data, jejichž klinický význam bude v budoucnosti zcela zásadní.

### 3. METODIKA

#### 3.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS

##### 3.1.1. Charakteristika souboru

Do této retrospektivní, průřezové studie bylo zařazeno souhrnně 164 pacientů, u kterých byl v letech 2012 až 2019 na Neurologické klinice 2. LF UK a FN Motol proveden odběr likvoru v rámci rutinního diagnostického procesu a jeho následná archivace.

Celkem bylo zařazeno 71 pacientů s diagnózou ALS, nebo jejich variant (Tab. 3). Diagnóza ALS byla stanovena na základě: (1) nálezů v objektivním neurologickém vyšetření (izolované motorické postižení s absencí léze somatosenzorického systému v dermatomech, korespondujících k postiženému myotomu, za respektování vylučujících kritérií) (2) průkazu postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu v EMG vyšetření v souladu s Awaji kritérii, stanovujícími mandatorní elektrofyziologické abnormality (de Carvalho M. et al., 2008) (3) po realizaci relevantních diagnostických testů k exkluzi alternativních diagnóz (4) na základě dokumentované progresy motorických deficitů v čase. Pro výslednou diagnózu byla implementována kritéria na základě návrhu revize El Escorial kritérií z roku 2015 (Ludolph A. et al., 2015), umožňující zařazení i pacientů s průkazem pouze izolovaného postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu ve dvou a více regionech, jakožto jedné ze dvou cílových zkoumaných skupin, v souladu se základní hypotézou studie. Zhodnotili jsme i podíl pacientů se souběžným výskytem frontotemporální demence – diagnóza FTD byla stanovena v souladu s diagnostickými kritérii dle Stronga z r. 2009 (Strong MJ. et al., 2009).

Dle záznamů ze zdravotnické dokumentace byla určena referovaná lokalizace prvních projevů onemocnění (bulbární, spinální) a na základě korelace s dokumentovaným objektivním neurologickým nálezem (resp. nálezem v EMG vyšetření) a pro účely statistické analýzy byli poté pacienti kategorizováni do jedné ze tří podskupin: ALS-SMN (izolované postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu bez dokumentovaných projevů léze kortikospinální dráhy;  $n = 15$ ), ALS-klasická (iniciální postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu a kortikospinální dráhy alespoň v jednom regionu;  $n = 36$ ) a ALS-bulbární (iniciální postižení bulbárního  $\alpha$ -motoneuronu a/nebo kortikobulbární dráhy;  $n = 20$ ).

Pro účely další analýzy a korelace nálezů vůči sobě byl celý soubor pacientů s ALS dále rozdělen podle kritéria přítomnosti radiologického nálezu, suspektního z komprese radixů, nebo míchy. Podskupina ALS pacientů, u které v iniciální fázi diferenciatně

diagnostického procesu panovalo důvodné podezření na kompresivní etiologii neurologických deficitů, nebo tato diagnóza byla i chybně stanovena a vedla k nesprávně indikované chirurgické léčbě ještě před referováním na naše pracoviště, byla označena jako ALS-komprese (n = 18). Kritéria suspektního radiologického nálezu (MRI) byla stanovena pro

1) cervikální region jako:

- a. nález spondylogenní cervikální myelopatie
- b. index cervikální komprese (CCI) stupeň 3 (Lee SH. et al., 2010)
- c. nebo nález foraminostenózy ve  $\geq 2$  etážích, korespondujících s distribucí neurologického deficitu

2) lumbální region jako:

- a. průřezová plocha durálního vaku  $< 100 \text{ mm}^2$  (Schönström N. a Willén J., 2001)
- b. nebo nález foraminostenózy ve  $\geq 2$  etážích, korespondujících s distribucí neurologického deficitu

Diagnóza ALS byla stanovena na základě pečlivé korelace elektrofyzilogických a radiologických nálezů (průkaz postižení spinálních a/nebo bulbárních alfa-motoneuronů v regionech bez průkazné kompresivní léze nervových struktur), resp. klinického průkazu další následné progresy motorických deficitů mimo regiony dokumentované komprese. U zbylých pacientů souboru (n = 53) nebyla naplněna kritéria suspektního radiologického nálezu (ALS-non-komprese).

U všech pacientů bylo stanoveno skóre na škále ALSFRS-R v čase, nejbližším k době realizace odběru likvoru. Byla stanovena doba (v měsících) od první manifestace projevů ALS do realizace lumbální punkce. Dále pak byla kalkulována rychlost progresy deficitů pomocí tzv.  $\Delta\text{FS}$  skóre, na základě vzorce:  $(48 - \text{ALSFRS-R skóre v době prvního skórování}) / (\text{doba trvání v měsících od manifestace do prvního skórování})$ . Jedná se o validovaný a obecně rozšířený prognostický nástroj, využívající běžně dostupných klinických údajů (Kimura F. et al., 2006; Elamin M. et al., 2015). Na základě individuální kalkulované rychlosti progresy poté byli všichni pacienti s ALS dále rozděleni na pomalé ( $\Delta\text{FS} < 0,3$ , tzn. 25. percentil v souboru ALS; n = 20), středně rychlé - intermediární ( $\Delta\text{FS}$  v rozmezí hodnot  $0,3 - 1$ ; n = 30) a rychlé progresory ( $\Delta\text{FS} > 1$ , tzn. 75 percentil v souboru ALS; n = 21).

Zbylých 93 pacientů celého souboru mělo stanovenou jinou finální diagnózu, než ALS (Tab. 3). První kohortu tvořili pacienti se spondylogenní cervikální myelopatií (akutní i chronické formy), pluriradikulopatií v důsledku lumbální spinální stenózy nebo víceetážové foraminostenózy, nebo pacienti s monoradikulární lézí v důsledku disko- nebo spondylogenní komprese (Komprese; n = 30) (Tab. 4). U každého z těchto 30 pacientů byla k dispozici zdravotnická dokumentace s údaji stran následného vývoje po dobu minimálně jednoho roku od provedení lumbální punkce, ze které bylo průkazné, že nedošlo k rozvoji nových motorických deficitů, suspektních z ALS. Další kohortu v rámci kontrolní skupiny pacientů poté tvořila kohorta neurologických kontrol (“Neurologické kontroly”, n = 63). Jednalo se o pacienty s postižením periferního nervového systému v důsledku několika různých etiologických jednotek – chronické zánětlivé demyelinizační polyneuropatie (n = 23), chronické axonální idiopatické polyneuropatie (n = 19), polyneuropatického syndromu v důsledku přesně definované etiologie (např. diabetická polyneuropatie, paraproteinemická polyneuropatie aj., n = 6), myasthenia gravis (n = 5), myopatie (n = 4), resp. funkční poruchy hybnosti (n = 6) (Tab. 5).

### **3.1.2. Stanovení hladin neurofilament**

U všech pacientů (71 pacientů s ALS a 93 pacientů s ostatními diagnózami) byl vyšetřen likvor ke kvantifikaci hladin p-NfH a NfL; u 62 pacientů s ALS a dalších 62 pacientů s ostatními diagnózami (26 pacientů s myelo-/radikulopatií and 36 neurologických kontrol) byla provedena rovněž kvantifikace hladin p-NfH v séru. Stanovení hladin obou analytů v likvoru a p-NfH v séru bylo provedeno pomocí komerčně dostupných, dedikovaných souprav pro vyšetření metodou ELISA. Likvor byl odebrán standardní procedurou lumbální punkce, následně centrifugován, rozdělen na alikvoty a následně v intervalu maximálně do dvou hodin od odběru hluboce zmrazen na teplotu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Při této teplotě byl vzorek uchován až do provedení vyšetření ELISA soupravou. Párový vzorek séra, který byl odebrán současně s odběrem likvoru, byl zpracován a uschován zcela identickou metodou. V likvoru byla u všech vzorků stanovena celulizace, koncentrace albuminu, resp. souběžně byla stanovena koncentrace albuminu v séru a následně byl kalkulován poměr koncentrací v těchto dvou kompartmentech (Qalb) podle standardního Reiberova vzorce (Reiber H., 1979). Pro stanovení obou analytů byly využity ELISA soupravy, certifikované pro in vitro diagnostiku, v souladu s instrukcemi výrobce. Konkrétně byla pro stanovení hladin NfL v likvoru použita souprava od UmanDiagnostics AB (Umea, Sweden, kit No. 10-7001 CE); pro stanovení p-NfH v obou tělesných tekutinách souprava od Euroimmun AG (Luebeck, Germany): pro stanovení analytu v likvoru souprava č. EQ 6561-9601 s

výrobce deklarovaným limitem citlivosti detekce na hodnotě 27 pg/ml; pro stanovení v séru poté souprava č. EQ 6562-9601 s deklarovaným limitem citlivosti detekce na hodnotě 1,7 pg/ml. Náhodně vybrané vzorky byly měřeny duplicitně za účelem stanovení variačního koeficientu opakovatelnosti, který pro soupravu ke stanovení NfL činil 1%, pro soupravu ke stanovení p-NfH v likvoru 8% a pro p-NfH v séru 4,4%.

### 3.1.3. Statistická analýza

Normalita rozložení kontinuálních proměnných byla testována pomocí Shapirova-Wilkova testu. Porovnání neparametrických dat bylo realizováno pomocí Kruskal-Wallisova testu. V případě detekce statisticky významného rozdílu bylo následně doplněno post-hoc srovnání dvou souborů hodnot pomocí oboustranného Mann-Whitney U testem, s úrovní signifikance  $p < 0,05$ , s následnou Bonferonniho korekcí pro vícečetná srovnání. Demografické (věk, pohlaví) a klinické údaje (varianta ALS, rychlost progresu a délka trvání nemoci) byly zhodnoceny jako kovarianty pomocí modelu mnohonásobné lineární regrese. Kategorické proměnné byly vzájemně srovnávány pomocí Pearsonova chi-kvadrát testu nebo Fischerova exaktního testu (volen pro výrazně rozdílně velké soubory, nebo počet členů skupiny v jedné kategorii  $< 5$ ). Korelační analýza dat byla realizována pomocí Kendallova korelačního testu (který byl zvolen s ohledem na častý výskyt hodnot stejného, tzv. „svázaného pořadí“ a zároveň relativně malý datový soubor). Diagnostická síla p-NfH (v likvoru i v séru) a NfL byla stanovena kalkulací plochy pod křivkou (AUC – area under the curve) na základě konstrukce křivek ROC (receiver operating characteristics) analýzy. Optimální hodnota diagnostické meze byla kalkulována třemi odlišnými metodami: (1) podle nejvyšší hodnoty Youdenova J-indexu; (2) podle metody nastavení cílové požadované senzitivity testů na 90 % za účelem modelování klinického scénáře, jehož cílem je minimalizace falešně negativních výsledků; (3) při nastavení cílové požadované specificity testu na 90 % za účelem modelování funkce konfirmačního testu, kdy cílem je minimalizace falešně pozitivních výsledků. Pro každou stanovenou optimální hodnotu diagnostické meze byly následně kalkulovány hodnoty senzitivity, specificity, pozitivní a negativní prediktivní hodnoty včetně jejich 95 % intervalů spolehlivosti (IS). Analýza a tvorba tabulek byla provedena za využití softwarových nástrojů IBM SPSS Statistics 28, MSOffice (boxplot diagramy) a dále R 4.2 (pROC a ROCit balíčky).

**Tab. 3** Základní tři kohorty studijního souboru (n = 164)

	<b>ALS</b> (n=71)	<b>Komprese</b> (n=30)	<b>Neurologické kontroly</b> (n=63)
<b>N (likvor/sérum)</b>	71/62	30/26	63/36
<b>Ženy</b>	34 (47,9 %)	11 (36,7 %)	25 (39,7 %)
<b>Věk (roky)</b>	59 (27; 81)	63,5 (33; 83)	58 (21; 81)

**Tab. 4** Podskupiny kohorty kompresivních myelo-/radikulopatií (n = 30)

	<b>Akutní myelopatie</b> (n=6)	<b>Chronické myelopatie</b> (n=6)	<b>Pluriradikulární komprese</b> (n=10)	<b>Monoradikulární komprese</b> (n=8)
<b>Ženy</b>	2 (33,3 %)	3 (50 %)	3 (30 %)	3 (37,5 %)
<b>Věk (roky)</b>	70 (41;78)	48 (41;58)	67 (57;83)	64 (34;80)

**Tab. 5** Struktura kohorty neurologických kontrol (n = 63)

<b>Etiologická jednotka</b>	<b>n</b>	<b>Pohlaví (ženy)</b>	<b>Věk</b>
<b>CIDP a MMN</b>	23	7 (30,4 %)	56 (21;77)
<b>CIAP</b>	19	5 (26,3 %)	59 (48;81)
<b>Polyneuropatie jiné</b>	6	4 (66,7 %)	61 (47;73)
<b>Myasthenia gravis</b>	5	1 (20 %)	71 (28;74)
<b>Myopatie</b>	4	3 (75 %)	51 (30;62)
<b>Funkční poruchy hybnosti</b>	6	5 (83,3 %)	50 (42;61)

CIDP – chronická inflamatorní (zánětlivá) demyelinizační polyradikuloneuropatie; MMN – multifokální motorická neuropatie; CIAP – chronická idiopatická axonální polyneuropatie

### 3.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS

#### 3.2.1. Charakteristika souboru

Jednalo se o průřezovou studii, komponovanou ze dvou jednotlivých kohort. Do studie jsme zařadili souhrnně 88 českých pacientů, z čehož u 9 se jednalo o familiární formu onemocnění (fALS) a u zbylých 79 byl výskyt onemocnění sporadický (sALS). Zařazení byli pacienti ze dvou Neuromuskulárních Center (NMC) –NMC Neurologické kliniky 2.

Lékařské Fakulty Univerzity Karlovy a FN Motol, Praha (71 pacientů) a NMC Neurologické kliniky Lékařské fakultz Masarykovy Univerzity a FN Brno (17 pacientů).

Diagnóza ALS byla stanovena specialistou na neuromuskulární problematiku poté, co byly relevantními diagnostickými testy (magnetická rezonance mozku a/nebo příslušných etáží páteře a míchy, likvorová, sérologická, popř. cílená molekulárně-genetická vyšetření) vyloučeny alternativní diagnózy; a to v souladu s návrhem revize El-Escorial diagnostických kritérií z roku 2015 (Ludolph A. et al., 2015). Diagnóza frontotemporální demence byla stanovena v souladu s diagnostickými kritérii dle Stronga z r. 2009 (Strong MJ. et al., 2009). Familiární forma ALS byla definována jako výskyt ALS, resp. FTD u minimálně jednoho dalšího příbuzného. U všech pacientů jsme kromě základních demografických ukazatelů určili klinický fenotyp, tzn. region rozvoje prvních projevů onemocnění (spinální, bulbární), včetně podtypů (Tab. 6).

Jak již bylo zmíněno, studie byla komponována ze dvou jednotlivých kohort pacientů. U první se jednalo o kohortu s longinudinálním, prospektivním nábořem pacientů v rámci výzkumného projektu, který probíhal v letech 2015 až 2020. Souhrnem bylo do této kohorty zařazeno 52 pacientů, vyšetřených v NMC Neurologické kliniky 2.LF UK a FN Motol; vzorky jejich krve byly vyšetřeny metodami molekulární genetiky v laboratoři Ústavu lékařské genetiky a biologie 2. LF UK a FN Motol, Praha. Do druhé kohorty bylo retrospektivně zařazeno 36 pacientů (19 pacientů z NMC FN Motol; 17 pacientů z NMC FN Brno), u kterých bylo mezi roky 2019 – 2023 molekulárně genetické vyšetření indikováno v rámci rutinní klinické konzultace a to na základě anamnézy rodinného výskytu onemocnění, časného věku rozvoje onemocnění (který je definován dle široce akceptovaného konsenzu jako <45 let; Tab. 6) (Turner MR. et al., 2012), resp. současné přidružené frontotemporální demence. Poslední dvě kritéria (časný věk nástupu, přidružená FTD) byla převzata na základě expertního názoru, resp. konsenzuálního doporučení některých autorů jako klinické markery vyšší pravděpodobnosti záchytu kauzální mutace (Turner MR. et al., 2017). Kritéria časného věku rozvoje onemocnění byla zároveň využita k vymezení specifické podskupiny pacientů za účelem analýzy asociace mezi tímto atributem a frekvencí patogenních mutací. Vzorky všech 36 pacientů byly analyzovány metodami molekulárně genetických vyšetření v laboratoři Centra molekulární biologie a genetiky, Interní hematoonkologické kliniky FN Brno a Masarykovy Univerzity.

**Tab. 6** Demografie a klinická charakteristika souboru (n = 88)

<b>Věk (roky)</b>	51,2 (19; 82)
<b>Pacienti s časným rozvojem (&lt;45 let)</b>	24 (27,3%)
<b>Pohlaví</b>	
Ženské	38 (43,2%)
<b>fALS</b>	9 (10,1%)
<b>Region rozvoje</b>	
<b>Spinální</b>	68 (77,3%)
<b>Subtypy</b>	
klasická ALS	57 (83,8%)
Jen spinální $\alpha$ -motoneuron	9 (13,2%)
přidružená FTD	2 (3,0%)
<b>Bulbární</b>	20 (22,7%)
<b>Subtypy</b>	
Jen bulbární	15 (75,0%)
přidružená FTD	5 (25,0%)

ALS – amyotrofická laterální skleróza; klasická ALS – postižení kortikospinální dráhy a spinálního  $\alpha$ -motoneuronu současně min. v jednom regionu; fALS – min. jeden přímý příbuzný s ALS a / nebo FTD; FTD – frontotemporální demence; kontinuální data prezentována jako median (min; max), kategorické proměnné jako absolutní čísla a procentuální podíl

### 3.2.2. Metody molekulárně genetického vyšetření a analýzy

Veškeré vzorky pacientů z prospektivní kohorty (n = 52) byly zpracovány a analyzovány v laboratoři Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol, všechny vzorky z retrospektivní kohorty (n = 36) byly zpracovány a analyzovány v laboratoři Centra molekulární biologie a genetiky, Interní hematologické kliniky FN Brno a Masarykovy Univerzity. Procedury, týkající se DNA izolace, analýzy DNA k detekci hexanukleotidové expanze v genu *C9orf72*, přípravy DNA knihoven, zpracování získaných dat a anotace DNA sekvencí se mezi oběma laboratořemi lišily. Finální zhodnocení patogenicity detekovaných variant bylo realizováno na základě identických kritérií.

Analýza byla zaměřena na detekci vzácných variant v genech, průkazně zapojených do patofyziologických procesu, asociovaných s rozvojem ALS (Tab. 7). Volba těchto genů vycházela z databáze expertního panelu Genomics England PanelApp v.1.69 (<http://panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/263/>) a rovněž z databáze GeneReviews (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1450/>). Způsoby dědičnosti pro jednotlivé geny



(autozomálně dominantní, autozomálně recesivní, gonozomálně dominantní) byly rovněž převzaty z údajů ve výše zmíněných zdrojích.

V prospektivní kohortě byla genomová DNA získána z periferní krve za využití soupravy Gentra Puregen Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany), nebo extrakčního systému MagCore H16 se soupravou MagCore Genomic DNA Large Volume Whole Blood Kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan). U všech pacientů bylo jako první krok provedeno vyšetření ke zhodnocení přítomnosti nebo nepřítomnosti expanze v genu *C9orf72*. Zhodnocení délky hexanukleotidové repetice G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, tedy zda je přítomná pouze normální alela, nebo také expanze delší než 60 G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, bylo realizováno pomocí tzv. repeat-primed PCR metody (polymerase chain reaction – řetězová polymerázová reakce), popsané DeJesus-Hernandesovou et al. (DeJesus-Hernandez M. et al., 2011). Výsledné produkty repeat-primed PCR reakce byly analyzovány pomocí kapilární elektroforézy v DNA analyzátoru ABI3730.

Každý vzorek od pacienta z prospektivní kohorty byl následně vyšetřen metodami sekvenování klinického exomu (pokrývá exony genů, ve kterých jsou varianty asociované s humáními patologiemi a též geny, u kterých se na základě funkce jejich produktů předpokládá patologický efekt variant; obsahuje přibližně 5000-6000 genů), nebo celoexomového sekvenování (obsahuje exony všech genů, kódující bílkoviny v genomu, tedy přibližně 20 000 genů). Příprava DNA knihoven byla realizována za využití tří odlišných souprav na základě aktuální dostupnosti konkrétní soupravy v laboratoři. Využity byly soupravy: 1. TruSight One kit (TSO) od výrobce Illumina Inc, San Diego, CA, USA a to u 18 vzorků; 2. souprava SureSelect Focused Exome kit (SSFE) od výrobce Agilent, Santa Clara, CA, USA, a to u 22 vzorků; a nakonec 3. souprava SeqCap EZ MedExome kit (SCEZME) od výrobce Roche, Madison, WI, USA pro přípravu 12 vzorků. DNA knihovny byly sekvenovány za využití sekvenátorů HiSeq 2500 nebo NovaSeq 6000 (oba od výrobce Illumina, USA), za využití sekvenační chemie HiSeq Rapid Cluster kit v2 and Rapid SDS Kit v.2, nebo NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit v1.5 s délkou čtení z obou stran – 2x100 bází (200 cyklů sekvenování).

Data, získaná sekvenováním ve formě fastq, byla zpracována bioinformatikem v následovných krocích: po kontrole kvality byla čtení mapována na referenční sekvenci lidského genomu hg19/GRCh37 za využití softwaru Novoalign (v4.02.03) nebo BWA (v4.02.03). Data byla dále zpracovávána v souladu s doporučeními pro správnou praxi dle GATK (Genome Analysis Toolkit). Konverze souborů ve formátu SAM do formátu BAM

a vyřazení duplicit bylo docíleno pomocí softwaru Picard Tools. Nástroj GATK3.8 byl použit pro lokální alignment (přirazení) kolem indelů, rekalibraci bází, rekalibraci variant a genotypizaci. Analýza variability počtu kopií (copy number variaton – CNV) nebyla v rámci prospektivní kohorty prováděna. Anotace variant byla provedena pomocí SnfEff4.3T a Ensembl v.75 softwaru a získané údaje byly zaneseny do databáze GEMINI (0.30.2), poté co bylo provedeno jejich protřídění, jak je popsáno níže.

V rámci retrospektivní kohorty byla genomová DNA izolována z leukocytů periferní krve standardní vysolovací metodou. Zhodnocení délky repetice v příslušné oblasti genu *C9orf72* gene bylo provedeno pomocí certifikované sestavy AmplideX<sup>®</sup> PCR/CE *C9orf72* Kit (Asuragen, USA) v souladu s instrukcemi výrobce. Za účelem identifikace sekvenčních variant v genech, asociovaných s ALS (Tab. 7) byla využita souprava KAPA HyperChoice (Roche, USA) “sequence capture“ (používá se k obohacení zájmových genomických oblastí pomocí oligonukleotidů, extrahujících komplementární DNA prostřednictvím hybridizace), s následným sekvenováním nové generace na přístroji NextSeq 500 (Illumina, USA) s chemií NSQ 500/550 Mid Output KT v2.5 s obousměrnou délkou čtení 2x150 bází (300 cyklů sekvenování). Individuální sekvence DNA byly seřazeny podle referenční humánní genomové sekvence hg19/GRCh37 a varianty byly vyvolány za využití software CLC Genomics Workbench (QIAGEN). Analýza byla navržena jednak k detekci krátkých genových variant, jednak rozsáhlých genových delecí a duplikací za využití zhodnocení variability počtu kopií.

V obou kohortách byly varianty v rámci vyšetřovaných genů, asociovaných s ALS, vyloučeny z další analýzy za předpokladu, že jejich alelická frekvence překračovala 0.1% podle údajů z databáze The Genome Aggregation Database (gnomAD v2.1), resp. pokud překračovala frekvenci 0.5% v lokální České databázi genetických variant. Intronové a synonymní varianty, resp. varianty, kategorizované jako benigní nebo pravděpodobně benigní v databázi ClinVar (23/05/2023) byly rovněž vyřazeny z dalšího hodnocení. Zbylé varianty byly srovnány s údaji v databázích ClinVar, Human Gene Mutation Database (HGMD Professional 2023.4), gnomAD and dalších populačních databázích (dbSNP 156 a 1000 Genomes) k rozšíření informací o dané variantě. Klasifikace jednotlivých variant proběhla v souladu s kritérii, stanovenými standardy American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Richards S. et al., 2015), pomocí softwaru Alamut Visual Plus v.7.1 a nástrojů VarSome (<https://varsome.com>) a Franklin (<https://franklin.genoox.com>). Pro zhodnocení klasifikace bylo zohledněno i výsledné

skóre prediktivních bioinformatických nástrojů pro missense varianty (PolyPhen-2, SIFT a CADD), resp. pro sestřihové varianty (SpliceAI), získané ze softwaru Alamut a platform The Varsome a Franklin. Klíčové a rozhodující pro finální klasifikaci varianty byla kritéria ACMG, typ dědičnosti a rovněž vliv konkrétního genu na patogenezi ALS. Získané údaje byly ještě kontrolně ověřeny a srovnány s údaji z expertního panelu ([www.clinicalgenome.org](http://www.clinicalgenome.org)) a z dostupné literatury.

Všechny patogenní nebo pravděpodobně patogenní varianty byly confirmovány pomocí Sangerova sekvenování za využití soupravy BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) na sekvenačním přístroji ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Statistická analýza (porovnání asociace klinických znaků s četností patogenních mutací) byla realizována za využití oboustranného Fisherova exaktního testu, s úrovní významnosti zvolenou jako  $p < 0,05$ .

**Tab. 7** Vybrané geny, asociované s ALS, vyšetřené v našem souboru

<p><i>ALS2, ANG, ANXA11, AR, C9orf72, CHCHD10*, CHMP2B, DAO**, DCTN1, ERBB4, FIG4, FUS, HNRNPA1, KIF5A, MAPT, MATR3, NEFH, NEK1, OPTN, PFN1, SCFD1**, SETX, SIGMAR1, SLC52A2, SLC52A3, SOD1, SPAST, SPG11, SQSTM1, TARDBP, TBK1, TUBA4A* UBQLN2, UNC13A*, VAPB, VCP</i></p>
---

Geny, které nebyly pokryty ve všech jednotlivých soupravách pro přípravu DNA knihoven (soupravy neobsahovaly sondy pro daný konkrétní gen) a tedy nebyly analyzovány jsou označeny \* – nebyly analyzovány v soupravách TrusightOne a Focus Exome \*\* – nebyly analyzovány v soupravách TrusightOne, Focus Exome ani KAPA HyperChoice

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS

#### 4.1.1. Srovnání klinických a demografických znaků

Mezi kohortou všech pacientů s ALS ( $n = 71$ ) a ostatními dvěma kohortami nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v zastoupení pohlaví ani ve věkové struktuře (Tab. 8). V rámci srovnání jednotlivých podskupin kohorty pacientů s ALS byl poté průkazný signifikantně vyšší věk u pacientů s ALS a současnou kompresí (Tab. 8) oproti zbytku souboru; při srovnání podskupin, rozdělených na základě rychlosti progresu, vykazovali rychlí progresoři nejkratší a pomalí progresoři nejdelší interval mezi rozvojem onemocnění a provedením odběru likvoru (Tab. 9). Při srovnání mezi podskupinami, rozdělenými podle kritérií přítomnosti komprese, nebo podle klinického fenotypu, nebyly v tomto ohledu zjištěny žádné signifikantní rozdíly (Tab. 10; Tab. 11). Co se týče parametru rychlosti progresu ( $\Delta$  FS), průměrná hodnota tohoto ukazatele byla u fenotypu ALS-SMN signifikantně nižší ve srovnání se skupinou ALS-B (Tab. 11). Konzistentně s předchozím nálezem bylo zastoupení pomalých progresorů v rámci fenotypu ALS-SMN významně vyšší a na druhou stranu zastoupení rychlých progresorů signifikantně nižší ve srovnání s fenotypem ALS-B (Tab. 11). U 8 pacientů (53,3 %) z podskupiny s fenotypem ALS-SMN ( $n = 15$ ) se v rámci dalšího vývoje onemocnění manifestovalo postižení kortikospinální dráhy - tito pacienti tedy konvertovali do klinického obrazu klasické ALS. U zbylých 7 pacientů byly v průběhu celého onemocnění dokumentovány pouze izolované projevy postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu. Tito pacienti naplnili kritéria PMA (progresivní muskulární atrofie) jako varianty ALS. Dále jsme pak v rámci souboru ALS-komprese pozorovali statisticky významně častější zastoupení fenotypu ALS-SMN (7/18 pacientů; 38,9 %) oproti zbytku souboru (8/53; 15,1 %) ( $p = 0,046$ ). Při zhodnocení radiologických nálezů u podskupiny ALS-komprese byla nalezena statisticky významná asociace klinického postižení kortikospinální dráhy s radiologickým nálezem cervikální stenózy stupně 3 dle CCI, ale nikoliv myelopatie (Tab. 12). Dále jsme pozorovali asociaci mezi fenotypem ALS-SMN a průkazem víceetážové radikulární komprese, korespondující s topikou dokumentovaného klinického postižení; tato asociace ale nebyla statisticky významná. Diagnózu současné FTD naplnilo v celém souboru ALS ( $n = 71$ ) 7 pacientů (9,86 %; 2 ženy, 5 mužů); pro účely statistické analýzy jsme ovšem tento malý soubor pacientů přiřadili dle iniciálních motorických projevů (4 pacienti do ALS-B, 3 pac. do ALS-spinální).

#### 4.1.2. Koncentrace neurofilament a dalších biochemických analytů

Pozorovali jsme statisticky významné rozdíly při srovnání hladin p-NfH v likvoru a rovněž v séru, hladin NfL v likvoru a rovněž hodnot proteinorhachie a albuminového kvocientu (Qalb), a to jak mezi kohortou ALS a kohortou myelo-/radikulopatií, tak mezi ALS a neurologickými kontrolami. Pacienti z kohorty ALS vykazovali signifikantně vyšší průměrné hodnoty p-NfH v likvoru i v séru a NfL v likvoru a naopak signifikantně nižší hodnoty Qalb a proteinorhachie ve srovnání s ostatními dvěma kohortami (Tab. 8, Obr. 2, 3, 4). U skupiny myelo-/radikulopatií jsme zároveň pozorovali signifikantně vyšší hladiny NfL ( $p < 0,001$ ) a rovněž p-NfH v likvoru ( $p = 0,003$ ), avšak nikoliv p-NfH v séru ( $p = 0,89$ ) ve srovnání s kohortou neurologických kontrol. V rámci modelu mnohonásobné lineární regrese, zohledňující věk a pohlaví jako kovarianty, byl potvrzen nezávislý signifikantní vliv přítomnosti ALS na hladinu NfL a p-NfH v likvoru ( $p < 0,001$ ), resp. na hladinu p-NfH v séru ( $p = 0,04$ ). Tento model potvrdil v celé studijní populaci ( $n = 164$ ) signifikantní efekt věku (nárůst hladiny souběžně s narůstajícím věkem) a také pohlaví (vyšší hladiny u mužů, než u žen) na hladiny NfL a p-NfH v likvoru ( $p < 0,001$  pro p-NfH i NfL i pro obě kovarianty). Co se týče p-NfH v séru, jeho hladinu nezávisle významně ovlivňoval věk ( $p = 0,044$ ), ale nikoliv pohlaví ( $p = 0,195$ ). V situaci, kdy byli tímto modelem testováni pouze pacienti s ALS, nebyl ovšem prokázán signifikantní efekt věku ani pohlaví na hladiny NfL (věk:  $p = 0,654$ ; pohlaví:  $p = 0,223$ ), resp. p-NfH (věk:  $p = 0,138$ ; pohlaví:  $p = 0,552$ ) v likvoru. V rámci kohorty myelo-/radikulopatií jsme pozorovali nejvyšší hladiny p-NfH a NfL v likvoru u akutních (2185, resp. 4895 pg/ml), nejnižší pak u chronických myelopatií (261, resp. 550 pg/ml); rozdíly hladin obou neurofilament mezi všemi čtyřmi podskupinami kohorty vůči sobě (Tab. 4) byly statisticky signifikantní ( $p < 0,001$ ).

##### 4.1.2.1. Koncentrace neurofilament v rámci různých podskupin ALS kohorty

Pacienti ze skupiny ALS-komprese ( $n = 18$ ) vykazovali nižší hladiny NfL v likvoru ( $p = 0,049$ ), ale nikoliv p-NfH v likvoru, resp. v séru, ve srovnání se zbytkem ALS kohorty ( $n = 53$ ) (Tab. 10). U skupiny ALS-komprese byly zjištěny signifikantně vyšší hladiny NfL ( $p = 0,048$ ) a rovněž p-NfH v likvoru ( $p = 0,007$ ) (Obr. 5), ale nikoliv p-NfH v séru ( $p = 0,164$ ) ve srovnání s kohortou myelo-/radikulopatií. ALS-ostatní vykazovali signifikantně vyšší hladiny všech biomarkerů ve srovnání s kohortou myelo-/radikulopatií (Tab. 10).

Pacienti z podskupiny ALS-SMN vykazovali signifikantně nižší hladiny NfL v likvoru než ALS-spinální ( $p = 0,003$ ) resp. ALS-B ( $p = 0,003$ ) pacienti (Tab. 11, Obr. 6). Hladina p-

NfH v likvoru byla u podskupiny ALS-SMN rovněž signifikantně nižší ve srovnání s podskupinou ALS-spinální ( $p = 0,008$ ), ale ne ve srovnání s podskupinou ALS-B ( $p = 0,027$ , nesignifikantní rozdíl po Bonferroniho korekci pro vícečetná srovnání) (Tab. 11). Hladiny p-NfH v séru se mezi žádnou ze tří jednotlivých podskupin (ALS-spinální, ALS-SMN, ALS-B) signifikantně nelišily ( $p = 0,347$ ). Nezávislý, statisticky signifikantní efekt fenotypu ALS-SMN na hladinu NfL v likvoru byl rovněž potvrzen modelem mnohonásobné lineární regrese, zohledňujícím věk, pohlaví, hodnotu  $\Delta$ FS a interval mezi manifestací onemocnění a provedením LP jakožto kovariant (vliv na rozdíl hladin mezi ALS-SMN a ALS-B:  $p = 0,01$ ; vliv na rozdíl hladin mezi ALS-spinální a ALS-SMN:  $p = 0,006$ ). Tento model pak prokázal nezávislý významný efekt fenotypu na hladinu p-NfH v likvoru při srovnání vůči podskupině ALS-spinální ( $p = 0,042$ ), ale nikoliv při srovnání vůči ALS-B ( $p = 0,075$ ). V rámci podskupiny ALS-SMN byly pak dále pozorovány statisticky významně nižší hladiny NfL ( $p = 0,002$ ) a p-NfH ( $p = 0,008$ ) v likvoru u pacientů, kteří zároveň naplňovali kritérium pomalé progresy ( $\Delta$ FS < 0,03,  $n = 8$ ), ve srovnání s hladinami u rychlých a intermediárních progresorů (kombinovaných pro účel statistické analýzy s ohledem na malý datový soubor do jedné skupiny,  $n = 7$ ). Mezi pacienty, u kterých bylo v rámci další progresy onemocnění později dokumentováno rovněž postižení kortikospinální dráhy ( $n = 8$ ) a pacienty s PMA ( $n = 7$ ) nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v hladinách p-NfH ( $p = 0,95$ ), resp. NfL ( $p = 0,68$ ) v likvoru. Při srovnání byla u podskupiny ALS-SMN oproti neurologickým kontrolám zjištěna signifikantně vyšší hladina NfL a p-NfH v likvoru (pro oba analyty  $p < 0,001$ ), ale nikoliv p-NfH v séru ( $p = 0,642$ ) (Tab. 13). Naopak při srovnání hladin mezi ALS-SMN a kohortou myelo-/radikulopatií nebyl nalezen signifikantní rozdíl hladin NfL a p-NfH v likvoru, resp. p-NfH v séru (Tab. 13).

V rámci srovnání podskupin kohorty ALS, rozdělené na základě rychlosti progresy, vykazovali rychlí progresoři statisticky signifikantně nejvyšší a pomalí progresoři nejnižší hladiny NfL v likvoru (Tab. 9, Obr. 7). Nezávislý efekt takto definovaných skupin na hladinu NfL v likvoru byl rovněž potvrzen modelem mnohonásobné lineární regrese, zohledňujícím věk, pohlaví, fenotyp (ALS-spinální, ALS-B a ALS-SMN) a interval do provedení LP jakožto kovariant (při srovnání pomalých a rychlých progresorů:  $p = 0,005$ , srovnání intermediárních a pomalých progresorů:  $p = 0,049$ ). Signifikantní efekt podskupiny na hladinu p-NfH v likvoru byl v tomto modelu pozorován pouze při srovnání mezi rychlými a pomalými progresory ( $p = 0,038$ ). Nebyl pozorován signifikantní rozdíl v hladinách p-NfH v séru mezi žádnou z těchto tří podskupin.

**Tab. 8** Srovnání klinických a biochemických ukazatelů mezi třemi hlavními kohortami studie

	ALS (n=71)	Myelo- /radikulopatie (n=30)	Neurologické kontroly (n=63)	p <sup>A</sup>	p <sup>B</sup>
N (likvor/sérum)	71/62	30/26	63/36		
Ženy	34 (47,9 %)	11 (36,7 %)	25 (39,7 %)	0,300	0,340
Věk (roky)	59 (27; 81)	63,5 (33; 83)	58 (21; 81)	0,218	0,675
p-NfH (pg/ml), likvor	2 660 (270; 40 000)	676 (155; 33 170)	380 (30; 2 560)	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
p-NfH (pg/ml), sérum	59 (8; 1 455)	27 (8; 1 883)	25 (9; 230)	<b>0,038</b>	<b>0,010</b>
NfL (pg/ml)	4 730 (446; 36 300)	1 470 (350; 10 000)	670 (90; 2 100)	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
Qalb	5,8 (3,0; 27,3)	9,6 (3,4; 19,4)	6,7 (2,0; 55,0)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,011</b>
Proteinorhachie (mg/l)	420 (215; 1 740)	623 (230; 1 200)	480 (245; 3 200)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,009</b>
Interval do LP (měsíce)	15 (2; 39)	–	–		

LP – lumbální punkce; QAlb – albuminový kvocient. Absolutní frekvence (procenta) jsou uvedena v případě kategoriálních proměnných. Pro kontinuální proměnné jsou hodnoty uvedeny jako medián (minimum; maximum). p<sup>A</sup> – zhodnocení rozdílů mezi kohortou ALS a Myelo-/radikulopatiemi ; 5; p<sup>B</sup> - zhodnocení rozdílů mezi kohortou ALS a Neurologickými kontrolami ; v obou srovnáních pomocí Mann-Whitneyova testu (v případě kontinuálních proměnných), resp. Pearsonova chi-kvadrát testu (pro kategoriální proměnné); aplikována 5% úroveň statistické signifikance

**Tab. 9** Srovnání pomalých, intermediárních a rychlých progresorů v rámci ALS

	Pomalí (n=20)	Intermediární (n=30)	Rychlí (n=21)	p
Ženy	7 (33,0 %)	15 (50,0 %)	12 (57,1 %)	0,349
Věk (roky)	55 (27; 75)	62 (30; 76)	60 (39; 81)	0,072
Interval do LP (měsíce)	28 (2; 39)	15,5 (4; 38)	8 (4; 22)	<b>&lt;0,001<sup>A,B,C</sup></b>
Δ FS	0,200 (0,050; 0,299)	0,525 (0,350; 0,960)	1,375 (1,000; 4,000)	<b>&lt;0,001<sup>A,B,C</sup></b>
p-NfH (pg/ml), likvor	1675 (270; 40 000)	2670 (340; 16 750)	4000 (2 230; 16 800)	<b>0,002<sup>A,C</sup></b>
p-NfH (pg/ml), sérum	52 (9; 159)	53 (8; 1 102)	97 (13; 1 455)	0,054
NfL (pg/ml)	2480 (446; 36 300)	4540 (1 450; 10 000)	7900 (3 954; 11 220)	<b>&lt;0,001<sup>A,B,C</sup></b>

p –Kruskal-Wallisův test (pro kontinuální proměnné) a Pearsonův chi-kvadrát test (pro kategoriální proměnné); 5% úroveň statistické signifikance; <sup>A</sup> statisticky signifikantní rozdíl mezi pomalými a rychlými progresory po provedení Bonferonniho korekce; <sup>B</sup> statisticky signifikantní rozdíl mezi pomalými a intermed. progresory po provedení Bonferonniho korekce, <sup>C</sup> statisticky signifikantní rozdíl mezi rychlými a intermed. progresory po provedení Bonferonniho korekce

**Tab. 10** Srovnání charakteristik mezi podskupinami ALS-komprese, ostatními ALS a myelo-/radikulopatiemi

	ALS- komprese (n=18)	Ostatní ALS (n=53)	Myelo- /radikulopatie (n=30)	p <sup>A</sup>	p <sup>B</sup>	p <sup>C</sup>
Ženy	6 (33,3 %)	28 (52,8 %)	11 (36,7 %)	0,153	0,815	0,156
Věk (roky)	66 (45; 81)	56 (27; 79)	64 (33; 83)	<b>0,004</b>	0,449	0,057
Interval do LP	16 (2; 38)	15 (4; 39)	N/A	0,706		
Δ FS	0,475 (0,050; 1,375)	0,600 (0,050; 4,000)	N/A	0,109		
p-NfH (pg/ml), likvor	2225 (535; 16 800)	2660 (270; 40000)	676 (155; 33 170)	0,658	<b>0,007</b>	<b>&lt;0,001</b>
p-NfH(pg/ml), sérum	67 (8; 456)	55 (9; 1 455)	27 (8; 1 883)	0,687	0,164	<b>0,041</b>
NfL (pg/ml)	4085 (480; 10 000)	5790 (446; 36 300)	1470 (350; 10000)	<b>0,049</b>	<b>0,048</b>	<b>&lt;0,001</b>

Prokategorické proměnné údaje absolutních hodnot (procenta); pro kontinuální proměnné je uveden medián (minimum; maximum) hodnot (non-normální rozložení dat) resp. průměr (standardní odchylka) (normální rozložení dat). p<sup>A</sup> –zhodnocení rozdílů mezi kohortami ALS-komprese a „Ostatní ALS“; p<sup>B</sup> – zhodnocení rozdílů mezi kohortou ALS-komprese a Myelo-/radikulopatie; p<sup>C</sup> - zhodnocení rozdílů mezi kohortou „Ostatní ALS“ a Myelo-/radikulopatie; všechna 3 srovnání pomocí Mann-Whitneyova testu nebo Studentova t-testu (pro kontinuální proměnné dle normality rozložení), nebo Pearsonovým chi-kvadrát testem / Fisherovým exaktním testem (pro kategorické proměnné); 5% úroveň statistické signifikance

**Tab. 11** Srovnání podskupin ALS-spinální, ALS-SMN a ALS-B

	ALS-spinální (n=36)	ALS-SMN (n=15)	ALS-B (n=20)	p
Ženy	13 (36,1 %)	8 (53,3 %)	13 (65,0 %)	0,104
Věk (roky)	57 (27; 81)	62 (38; 76)	62 (33; 79)	0,336
Pomalí	11 (30,6 %)	8 (53,3 %)	1 (5,0 %)	<b>0,018<sup>A</sup></b>
Intermediární	13 (36,1 %)	6 (40,0 %)	11 (55,0 %)	
Rychlí progresoři	12 (33,3 %)	1 (6,7 %)	8 (40,0 %)	
Interval do LP	16 (4; 39)	15 (2; 38)	10 (5; 36)	0,295
Δ FS	0,565 (0,050; 2,300)	0,300 (0,050; 3,000)	0,775 (0,300; 4,000)	<b>0,011<sup>A</sup></b>
p-NfH (pg/ml),likvor	2850 (340; 16 800)	865 (270; 40 000)	2535 (640; 6 800)	<b>0,017<sup>A</sup></b>
p-NfH (pg/ml), sérum*	62 (11; 1 455)	21 (8; 619)	75 (9; 1 102)	0,347
NfL (pg/ml)	4830 (1 450; 11 220)	2354 (446; 36 300)	5977 (1 560; 10 000)	<b>0,003<sup>A,C</sup></b>

Zhodnocení rozdílů pomocí Kruskal-Wallisova testu (pro kontinuální proměnné), resp. Pearsonova chi-kvadrát testu / Fischerova exaktního testu (pro kategorické proměnné); 5% úroveň statistické signifikance; <sup>A</sup>statisticky signifikantní rozdíl mezi ALS-SMN a ALS-B po provedení Bonferonniho korekce; <sup>B</sup>statisticky signifikantní rozdíl mezi ALS-spinální a ALS-B po provedení Bonferonniho korekce; <sup>C</sup>statisticky signifikantní rozdíl mezi ALS-spinální a ALS-SMN po provedení Bonferonniho korekce, \*hodnoty p-NfH v séru nebyly dostupné u všech pacientů: ALS-spinální (n=33), ALS-SMN (n=14), ALS-B (n=16).



**Tab. 12** Asociace mezi radiologickými a klinickými nálezy a koncentrací biomarkerů v rámci podskupiny ALS-komprese (n = 18)

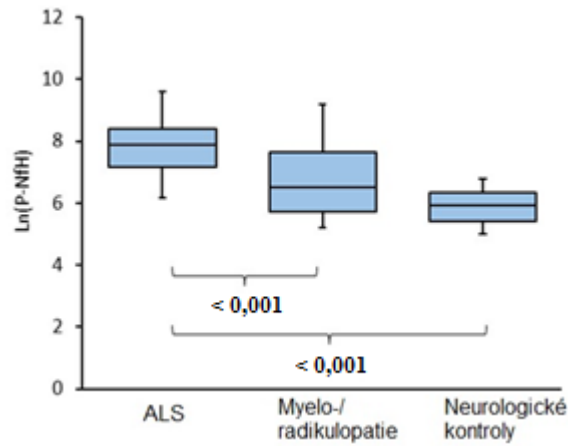
Radiologický nález	Klinický fenotyp		p
	ALS-SMN (n=7)	ALS-spinální (n=11)	
Myelopatie	1	3	0,623
CCI stupeň 3	1	8	<b>0,0498<sup>A</sup></b>
Pluriradikulární komprese	6*	7*	0,596
Chirurgický výkon	2 (28,5 %)	3 (27,3 %)	1,00
<b>Biomarkery</b>			
p-NfH (pg/ml), likvor	865 (535;16750)	2700 (1250;16800)	0,147
p-NfH (pg/ml), serum	19 (9;271)	70 (15;456)	0,378
NfL (pg/ml)	2240 (480;5910)	4350 (1450;10000)	<b>0,038<sup>A</sup></b>

p – zhodnocení rozdílů mezi kohortou ALS-SMN a ALS-spinální pomocí Mann-Whitneyovatestu (v případě kontinuálních proměnných) a pomocí Fischerova exaktního testu (pro kategorické proměnné); 5% úroveň statistické signifikance; \* pacienti vykazovali kombinovaný radiologický nález: tzn. foraminostenózu **A** současně CCI stupeň 3 nebo myelopatii, <sup>A</sup> statisticky signifikantní rozdíl mezi ALS-SMN a ALS-spinální

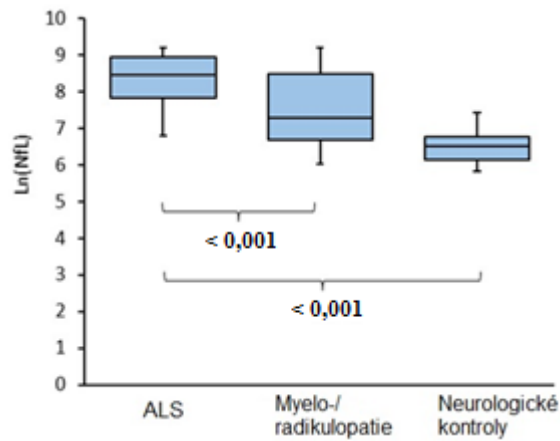
**Tab. 13** Srovnání nálezů mezi podskupinou ALS-SMN a kohortami Myelo-/radikulopatie a Neurologické kontroly

	ALS-SMN (n=15)	Myelo-/ radikulopatie (n=30)	Neurologické kontroly (n=63)	p <sup>A</sup>	p <sup>B</sup>
Ženy	8 (53,3 %)	11 (36,7 %)	25 (39,7 %)	0,286	0,336
Věk (roky)	62 (38; 76)	64 (33; 83)	58 (21; 81)	0,621	0,530
p-NfH (pg/ml), likvor	865 (270; 40 000)	676 (155; 33 170)	380 (30; 2 560)	0,178	<b>&lt;0,001</b>
p-NfH (pg/ml), sérum	21 (8; 619)	27 (8; 1 883)	25 (9; 230)	0,887	0,642
NfL (pg/ml)	2354 (446; 36 300)	1470 (350; 10 000)	670 (90; 2 100)	0,393	<b>&lt;0,001</b>
Qalb	6,1 (3.1; 27.3)	9,6 (3.4; 19.4)	6,7 (2.0; 55.0)	0,053	0,270
Proteinorhachie (mg/l)	415 (250; 1 740)	623 (230; 1 200)	480 (245; 3 200)	<b>0,014</b>	0,179

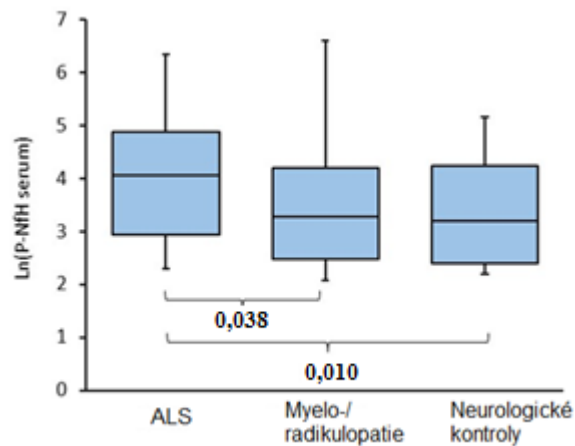
Pro kategorické proměnné údaje v absolutních hodnotách (procenta); pro kontinuální proměnné je uveden medián (minimum; maximum) hodnot. p<sup>A</sup> – zhodnocení rozdílů mezi kohortami ALS-SMN a Myelo-/radikulopatie; p<sup>B</sup> – zhodnocení rozdílů mezi kohortou ALS-SMN a Neurologické kontroly; pro obě srovnání využít Mann-Whitney test (pro kontinuální proměnné) nebo Fisherův exaktní test (pro kategorické proměnné); 5% úroveň statistické signifikance



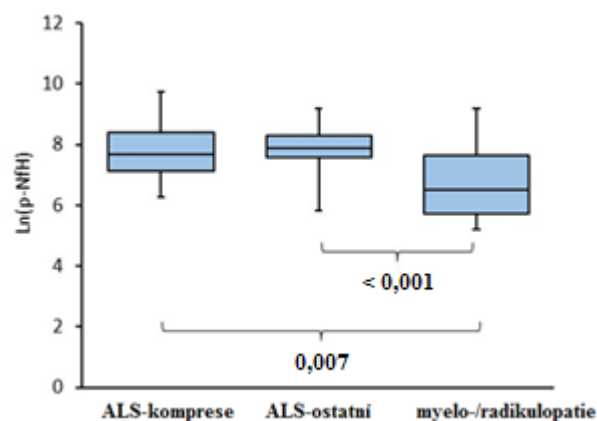
**Obr. 2** Srovnání přirozených logaritmů hodnot p-NfH (likvor) mezi ALS (n = 71), myelo-/radikulopatiemi (n = 30) a neurologickými kontrolami (n = 63)



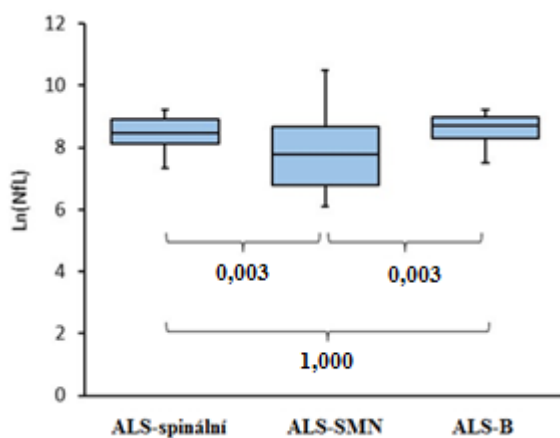
**Obr. 3** Srovnání přirozených logaritmů hodnot NfL (likvor) mezi ALS (n = 71), myelo-/radikulopatiemi (n = 30) a neurologickými kontrolami (n = 63)



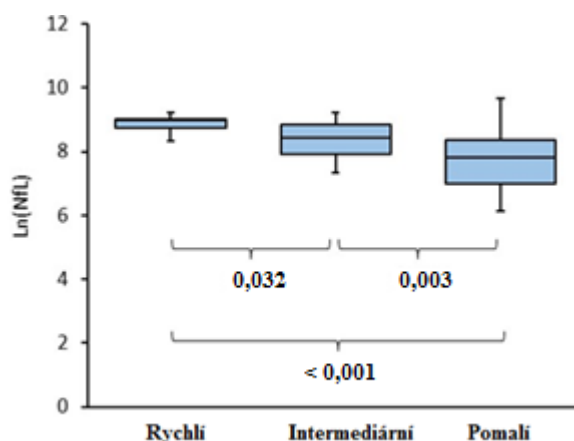
**Obr. 4** Srovnání přirozených logaritmů hodnot p-NfH (sérum) mezi ALS (n = 62), myelo-/radikulopatiemi (n = 26) a neurologickými kontrolami (n = 36)



**Obr. 5** Srovnání přirozených logaritmů hodnot p-NfH (likvor) mezi skupinami ALS-komprese (n = 18), ALS-ostatní (n = 53) a myelo-/radikulopatie (n = 30)



**Obr. 6** Srovnání přirozených logaritmů hodnot NfL (likvor) mezi skupinami ALS-spinální (n = 36), ALS-SMN (n = 15) a ALS-B (n = 20)



**Obr. 7** Srovnání přirozených logaritmů hodnot NfL (likvor) mezi podskupinami podle rychlosti progresse: rychlí (n = 21), intermediární (n = 30) pomalí (n = 19) progresoři

### 4.1.3. Korelace mezi biochemickými a klinickými ukazateli

Pozorovali jsme signifikantní, silnou pozitivní korelaci mezi věkem a hladinami NfL i p-NfH v likvoru v kohortě myelo-/radikulopatií (NfL  $\tau_b = 0,471$ ; p-NfH  $\tau_b = 0,372$ ) i neurologických kontrol (NfL  $\tau_b = 0,369$ ; p-NfH  $\tau_b = 0,313$ ), ale nikoliv u pacientů s ALS (Tab. 14). Hladiny p-NfH v séru signifikantně pozitivně korelovaly s věkem jen u myelo-/radikulopatií ( $\tau_b = 0,440$ ), nikoliv u neurologických kontrol, resp. ALS. Hladiny NfL a p-NfH v likvoru mezi sebou významně, silně a pozitivně korelovaly v celém souboru ( $\tau_b = 0,684$ ,  $p = 0$ ) i ve všech jednotlivých kohortách (Tab. 14). Hladiny p-NfH v likvoru a v séru rovněž signifikantně pozitivně korelovaly – v celém souboru silně ( $\tau_b = 0,357$ ;  $p = 0$ ), v jednotlivých kohortách pouze středně silně. Dále jsme pozorovali významnou, silnou pozitivní korelaci mezi hladinami NfL v likvoru a rychlostí progresu ( $\Delta$  FS) ( $\tau_b = 0,390$ ); korelace hladin p-NfH v likvoru v tomto ohledu byla rovněž signifikantní a pozitivní, ovšem pouze středně silná ( $\tau_b = 0,265$ ); pro p-NfH v séru pouze slabá ( $\tau_b = 0,190$ ). Hladiny NfL významně negativně korelovaly s délkou přežití a to středně silně ( $\tau_b = -0,285$ ). Mezi  $\Delta$  FS a délkou přežití byla prokázána významná negativní silná korelace ( $\tau_b = -0,375$ ).

**Tab. 14** Kendallův test korelace stanovených parametrů u tří hlavních kohort souboru

Parametry	ALS (n=71)		Myelo- /radikulopatie (n=30)		Neurologické kontroly (n=63)	
	$\tau_b$	p	$\tau_b$	p	$\tau_b$	p
Věk × p-NfH (likvor)	0,079	0,335	0,372****	<b>0,004</b>	0,313****	<b>&lt;0,001</b>
Věk × p-NfH (sérum)	-0,035	0,688	0,440****	<b>0,002</b>	0,176	0,139
Věk × NfL	-0,013	0,878	0,471****	<b>&lt;0,001</b>	0,369****	<b>&lt;0,001</b>
CB × p-NfH (likvor)	0,147**	<b>0,030</b>	0,313****	<b>0,016</b>	0,166	0,056
CB × NfL	0,142	0,081	0,333****	<b>0,010</b>	0,187**	<b>0,032</b>
Qalb × p-NfH (likvor)	0,189**	<b>0,015</b>	0,444****	<b>&lt;0,001</b>	0,180**	<b>0,038</b>
Qalb × NfL	0,143	0,080	0,424****	<b>0,001</b>	0,217****	<b>0,013</b>
p-NfH v likvoru × p-NfH v séru	0,280***	<b>0,014</b>	0,284****	<b>0,010</b>	0,283****	<b>0,013</b>
p-NfH (likvor) × NfL	0,575****	<b>&lt;0,001</b>	0,526****	<b>&lt;0,001</b>	0,657****	<b>&lt;0,001</b>
$\Delta$ FS x interval do LP	0,438****	<b>&lt;0,001</b>				
$\Delta$ FS × p-NfH (likvor)	0,265****	<b>0,001</b>				
$\Delta$ FS × p-NfH (sérum)	0,190**	<b>0,023</b>				
$\Delta$ FS × NfL	0,390****	<b>&lt;0,001</b>				
$\Delta$ FS × přežití (měsíce)	-0,375****	<b>&lt;0,001</b>				
NfL x přežití (měsíce)	-0,285***	<b>&lt;0,001</b>				

$\tau_b$  – Kendallovo tau; CB– celková bílkovina (likvor)\* velmi slabá korelace (0,0–0,09); \*\* slabá korelace (0,1–0,19); \*\*\* střední korelace (0,2–0,29); \*\*\*\* silná korelace (0,3–1)

#### 4.1.4. Diagnostická přesnost neurofilament pro odlišení ALS od ostatních jednotek

V rámci celé studijní populace ( $n = 164$ ) byla diagnostická síla hladin obou řetězců neurofilament v likvoru pro diskriminaci pacientů s ALS od ostatních dvou kohort na základě hodnoty plochy pod křivkou zhodnocena jako velmi dobrá (p-NfH v likvoru: AUC 0,885, IS 0,832–0,938; NfL v likvoru: AUC 0,892, IS 0,839–0,946; Tab. 15a, Obr. 8,9). V případě hladiny p-NfH v séru byla diagnostická síla pouze dostatečná (AUC 0,650, IS 0,553–0,746) (Tab. 15a). Při srovnání diagnostické síly hladin NfL a hladin p-NfH v likvoru nebyl zjištěn signifikantní rozdíl (srovnání hodnot AUC mezi dvěma ROC křivkami:  $p = 0,723$ ). Naopak, hladiny p-NfH i NfL v likvoru vykazovaly signifikantně vyšší diagnostickou sílu ve srovnání s hladinami p-NfH v séru (srovnání hodnot AUC mezi dvěma ROC křivkami pro p-NfH v likvoru x p-NfH v séru:  $p < 0,001$ , pro NfL x p-NfH v séru:  $p < 0,001$ ). Dále jsme stanovili tři různé hodnoty diagnostických mezí podle výchozích kritérií (podle Youdenova J-indexu, k dosažení cílové senzitivity testu 90% a k dosažení cílové specifinity testu 90%) (Tab. 15a). Co se týče hladin p-NfH v likvoru (jako testu k odlišení ALS od obou ostatních kohort současně), při stanovení diagnostické meze na hodnotu 1205 pg/ml na základě Youdenova J-indexu bylo dosaženo senzitivity testu 81,7 (IS 73,2–90,1) %, specifinity 86,0 (IS 78,5–92,5) %, přičemž pozitivní prediktivní hodnota testu (PPH) činila 81,7 (IS 78,5–92,5) % a negativní prediktivní hodnota (NPH) 86,0 (IS 76,9–92,3) %. Diagnostická mez, stanovená na základě cílové senzitivity 90 %, činila 625 pg/ml, s dosaženou specifitou testu 71,0 (IS 61,3–80,7) %. V situaci stanovení diagnostické meze na základě cílové specifinity 90 % činila tato hodnota 2101,5 pg/ml a test dosahoval senzitivity 67,6 (IS 55,5–78,2) %. Pro NfL v likvoru činila hodnota diagnostické meze, stanovené na základě Youdenova J-indexu, 2180 pg/ml a tato hodnota byla identická i při stanovení podle kritéria cílové specifinity 90 %; při této diagnostické mezi činila senzitivita testu 83,1 (CI 74,7–90,1) %, PPH poté činila 86,8 (IS 77,0–93,4) % a NPH 87,5 (IS 79,9–94,5) %. V situaci stanovení podle kritéria cílové senzitivity na 90 % činila hodnota diagnostické meze 1525 pg/ml a test dosahoval specifinity 80,6 (IS 73,1–88,2) %. V situaci, kdy byla diskriminační schopnost hladin neurofilament testována pouze mezi kohortami pacientů s ALS a neurologickými kontrolami ( $n = 63$ ) (Tab. 15b), jsme pozorovali signifikantní nárůst diagnostické síly hladin p-NfH i NfL v likvoru (ale nikoliv p-NfH v séru), ve srovnání s jejich diagnostickou silou při diskriminaci mezi ALS a oběma ostatními kohortami, kombinovanými do jednoho souboru ( $n = 93$ ) (pro NfL v likvoru srovnání hodnot AUC mezi dvěma ROC křivkami  $p = 0,014$ ; pro p-NfH v likvoru srovnání hodnot AUC mezi dvěma ROC křivkami  $p = 0,044$ ;

pro p-NfH v séru srovnání hodnot AUC mezi dvěma ROC křivkami  $p = 0,46$ ). V této situaci (diskriminace pouze mezi kohortou ALS a neurologickými kontrolami) byla diagnostická síla excelentní. Zároveň jsme pozorovali snížení všech hodnot diagnostických mezí, nezávisle na aplikovaných kritériích jejich stanovení, stejně jako dosažení vyšších hodnot senzitivity, specificity, pozitivní i negativní prediktivní hodnoty testů (Tab. 15b).

**Tab. 15** Výsledky ROC analýzy při diskriminaci mezi pacienty

a) ALS (n = 71) vs. myelo-/radikulopatie + neurologické kontroly (n = 93):

Parametr	Diagnost. mez	Senzitivita (95% IS)	Specifická (95% IS)	PPH (95% IS)	NPH (95% IS)	AUC (95% IS)
p-NfH (pg/ml), likvor	1205*	<b>81,7%</b> (73,2–90,1%)	<b>86,0%</b> (78,5–92,5%)	<b>81,7%</b> (78,5–92,5%)	<b>86,0%</b> (76,9–92%)	<b>0,885</b> (0,832–0,938)
90% senzitivita	625	<b>90,1%</b> (83,1–95,8%)	<b>71,0 %</b> (61,3–80,7%)	<b>70,3 %</b> (59,9–86,0%)	<b>90,4 %</b> (81,2–94%)	
90% specifická	2101,5	<b>67,6 %</b> (55,5–78,2%)	<b>90,3 %</b> (82,4–95,5%)	<b>84,2 %</b> (72,8–90,2%)	<b>78,5 %</b> (68,5–89,2%)	
p-NfH (pg/ml), sérum	41,75*	<b>61,3%</b> (48,4–72,6%)	<b>64,5%</b> (53,2–75,8%)	<b>63,3%</b> (49,8–75,1%)	<b>62,5%</b> (49,5–74,0%)	<b>0,650</b> (0,553–0,746)
90% senzitivita	12,5	<b>90,3%</b> (82,3–96,8%)	<b>32,3%</b> (21,0–45,2%)	<b>57,1%</b> (46,7–67,0%)	<b>76,9 %</b> (55,9–90,3%)	
90% specifická	130	<b>25,8%</b> (14,5–37,1%)	<b>90,3%</b> (82,3–96,8%)	<b>72,7 %</b> (49,6–88,0%)	<b>54,9 %</b> (44,7–64,6%)	
NfL (pg/ml)	2180*	<b>83,1%</b> (74,7–90,1%)	<b>90,3%</b> (83,9–95,7%)	<b>86,8%</b> (77,0–93,4%)	<b>87,5%</b> (79,9–94,5%)	<b>0,892</b> (0,839–0,946)
90% senzitivita	1525	<b>90,1%</b> (83,1–95,8%)	<b>80,6%</b> (73,1–88,2%)	<b>78,0%</b> (73,1–90,7%)	<b>91,5%</b> (84,0–94,7%)	
90% specifická	2180	<b>83,1%</b> (74,7–90,1%)	<b>90,3%</b> (83,9–95,7%)	<b>86,8%</b> (77,0–93,4%)	<b>87,5%</b> (79,9–94,5%)	

b) ALS (n = 71) vs. neurologické kontroly (n = 63)

Parametr	Diagnost. mez	Senzitivita (95% IS)	Specifická (95% IS)	PPH (95% IS)	NPH (95% IS)	AUC (95% IS)
p-NfH (pg/ml), likvor	840*	<b>85,9%</b> (77,5–93,0%)	<b>93,7%</b> (87,3–98,4%)	<b>92,5%</b> (82,7–97,2%)	<b>86,5%</b> (75,5–93,3%)	<b>0,954</b> (0,904–0,981)
90% senzitivita	625	<b>90,1%</b> (83,1–97,2%)	<b>81,0%</b> (71,4–90,5%)	<b>84,8%</b> (74,6–91,6%)	<b>92,7%</b> (81,5–97,6%)	
90% specifická	727	<b>87,3%</b> (78,9–94,4%)	<b>90,4%</b> (82,5–96,8%)	<b>90,1%</b> (79,9–95,5%)	<b>87,5%</b> (76,3–94,1%)	
NfL (pg/ml)	1425*	<b>91,5%</b> (84,5–97,2%)	<b>93,7%</b> (87,3–98,4%)	<b>94,2%</b> (85,0–98,1%)	<b>90,7%</b> (80,3–96,2%)	<b>0,962</b> (0,928–0,996)
90% senzitivita	1500	<b>90,1%</b> (83,1–97,2%)	<b>93,7%</b> (87,3–94,8%)	<b>94,2%</b> (85,0–98,1%)	<b>89,4%</b> (78,7–95,3%)	
90% specifická	1216,5	<b>93,0%</b> (85,9–98,6%)	<b>90,5%</b> (82,5–96,8%)	<b>93,1%</b> (83,9–97,4%)	<b>92,0%</b> (81,7–97,0%)	

\*Diagnostická mez získaná na základě nejvyšší hodnoty Youdenova J-indexu pro danou ROC křivku. PPH – pozitivní prediktivní hodnota; NPV – negativní prediktivní hodnota; AUC – area under the curve / plocha pod křivkou; IS – interval spolehlivosti. Interval spolehlivosti pro AUC byl vypočítán dle DeLongovy metody variance. Intervaly spolehlivosti pro senzitivitu a specificku byly vypočítány pomocí 2000 stratifikovaných opakování bootstrapových výběrů.

Diagnostická síla hladin p-NfH v likvoru při odlišení skupiny ALS-komprese (n = 18) od kohorty myelo-/radikulopatií (n = 30), byla dobrá (Tab. 16a, Obr. 10; AUC 0,733, IS 0,592 – 0,875) a zároveň nebyla signifikantně nižší, než pro odlišení skupiny ALS-ostatní (n = 53) od myelo-/radikulopatií (Tab. 16b; AUC 0,774, IS 0,627-0,869; srovnání AUC mezi dvěma ROC křivkami: p = 0,341). Co se týče hladin p-NfH v séru (AUC 0,627, IS 0,444–0,809) a NfL v likvoru (AUC 0,672, IS 0,514–0,830; Tab. 16a, Obr. 11), jejich diagnostická síla byla pouze dostatečná, ale nikoliv signifikantně nižší, než při odlišení ALS-ostatní od myelo-/radikulopatií (Tab.16b; NfL likvoru pro ALS-ostatní x myelo-/radikulopatie: AUC 0,768, IS 0,621-0,862; srovnání AUC mezi dvěma ROC křivkami: p = 0,341). Pro hladinu p-NfH v likvoru činila diagnostická mez, stanovená pomocí Youdenova J-indexu, 607,5 pg/ml; při této hodnotě test dosahoval senzitivity 94,4 (IS 83,3-100) %, ovšem se specificitou pouhých 50 (IS 33,3-66,7) %. Pozitivní prediktivní hodnota testu při dané diagnostické mezi činila 53,1 (IS 35,0-70,5) % a negativní prediktivní hodnota 93,7 (IS 67,7-99,7) %. Při stanovení na základě kritéria cílové senzitivity 90% činila hodnota diagnostické meze 702 pg/ml, a test dosahoval specificitu opět pouze 50 (IS 33,3-66,7)%; při stanovení diagnostické meze podle kritéria cílové specificity 90% činila tato hodnota 5014 pg/ml a test dosahoval senzitivity pouze 22,2 (IS 5,6-44,4)%. V případě hladin NfL v likvoru činila hodnota diagnostické meze, kalkulovaná na základě Youdenova J-indexu, 2180 pg/ml, a test dosahoval senzitivitu 77,8 (IS 55,6-94,4) %, specificitu 70 (IS 53,3-86,7)%, s pozitivní prediktivní hodnotou 58,3 (IS 36,9-77,2)% a negativní prediktivní hodnotou 83,3 (IS 61,8-94,5)%. Pro cílovou senzitivitu 90% byla hodnota diagnostické meze 895 pg/ml, s dosaženou specificitou 33,3 (IS 16,7-50,0)%; pro cílovou specificitu 90% pak činila hodnota diagnostické meze 7682 pg/ml, se senzitivitou 11,1 (IS 1,9-36,0)%. V souhrnu jsme nebyli s využitím ani jednoho z kritérií jejího stanovení schopni docílit optimální diagnostické meze, aniž by došlo k zásadní ztrátě buď senzitivity, nebo specificity, což bylo nejvíce patrné pro hladiny p-NfH v likvoru. Z tohoto důvodu jsme aplikovali hodnoty diagnostických mezí, stanovené v rámci srovnání celé kohorty ALS proti zbytku studijní populace (p-NfH v likvoru: 1205 pg/ml, NfL v likvoru: 2180pg/ml). Při aplikování těchto diagnostických mezí bylo testem nadále 11 (36,7 %), resp. 9 (30%) pacientů ze skupiny myelo-/radikulopatií označeno jako (falešně) pozitivní, přičemž 7 těchto pacientů (z celkového počtu 10 v rámci této kohorty), kteří by testem byli označeni jako falešně pozitivní, podstoupilo úspěšnou chirurgickou dekompresi. Na druhou stranu, pět pacientů ze skupiny ALS-komprese (27,7% této podskupiny) bylo operováno na základě nesprávné indikace pro suspektní kompresivní

etiologii. Dva z těchto pěti pacientů (40%) by na základě stanovených hladin neurofilament v likvoru byli označeni jako falešně negativní.

**Tab. 16** Výsledky ROC analýzy při diskriminaci mezi pacienty

**a) ALS-komprese (n=18) a kohortou myelo-/radikulopatií (n = 30)**

<b>Parametr</b>	<b>Diagnost. mez</b>	<b>Senzitivita (95% IS)</b>	<b>Specifická (95% IS)</b>	<b>PPH (95% IS)</b>	<b>NPH (95% IS)</b>	<b>AUC (95% IS)</b>
p-NfH (pg/ml), likvor	607,5*	<b>94,4%</b> (83,3–100%)	<b>50,0%</b> (33,3–66,7%)	<b>53,1%</b> (35,0–70,5%)	<b>93,7%</b> (67,7–99,7%)	<b>0,733</b> (0,592–0,875)
90% senzitivita	702	<b>88,9%</b> (72,2–100%)	<b>50,0%</b> (33,3–66,7%)	<b>51,6%</b> (33,4–69,4%)	<b>88,2%</b> (62,2–97,9%)	
90% specifická	5014	<b>22,2%</b> (5,6–44,4%)	<b>90,0%</b> (80,0–100%)	<b>57,1%</b> (20,2–88,2%)	<b>65,8%</b> (49,3–79,4%)	
p-NfH (pg/ml), sérum	48*	<b>64,7%</b> (41,2–88,2%)	<b>73,1%</b> (53,9–88,5%)	<b>61,1%</b> (36,1–81,7%)	<b>76,0%</b> (54,4–89,8%)	<b>0,627</b> (0,444–0,809)
90% senzitivita	9,5	<b>82,3%</b> (55,8–95,3%)	<b>7,7%</b> (1,3–26,6%)	<b>36,8%</b> (22,3–54,0%)	<b>40,0%</b> (7,2–82,9%)	
90% specifická	150,5	<b>17,6%</b> (4,6–44,2%)	<b>88,5%</b> (68,7–96,9%)	<b>50,0%</b> (13,9–86,1)	<b>62,1%</b> (44,8–77,1%)	
NfL (pg/ml)	2180*	<b>77,8%</b> (55,6–94,4%)	<b>70,0%</b> (53,3–86,7%)	<b>58,3%</b> (36,9–77,2%)	<b>83,3%</b> (61,8–94,5%)	<b>0,672</b> (0,514–0,830)
90% senzitivita	895	<b>88,9%</b> (72,2–100%)	<b>33,3%</b> (16,7–50,0%)	<b>44,4%</b> (28,3–61,7%)	<b>83,3%</b> (50,9–97,1%)	
90% specifická	7616	<b>11,1%</b> (1,9%–36,0%)	<b>90,0%</b> (72,3–97,4%)	<b>40,0%</b> (7,2–82,9%)	<b>62,8%</b> (46,7–76,6%)	

**b) ALS-ostatní (n = 53) a kohortou myelo-/radikulopatií (n = 30)**

<b>Parametr</b>	<b>Diagnost. mez</b>	<b>Senzitivita (95% IS)</b>	<b>Specifická (95% IS)</b>	<b>PPH (95% IS)</b>	<b>NPH (95% IS)</b>	<b>AUC (95% IS)</b>
p-NfH (pg/ml), likvor	2300*	<b>67,9%</b> (53,3–79,7%)	<b>83,3 %</b> (64,6–93,7%)	<b>87,8%</b> (73,0–95,4%)	<b>59,5%</b> (43,3–74,0%)	<b>0,774</b> (0,627–0,868)
90% senzitivita	640	<b>90,5%</b> (78,7–96,5%)	<b>50,0%</b> (31,7–68,3%)	<b>76,2%</b> (63,5–85,6%)	<b>75,0%</b> (50,6–90,4%)	
90% specifická	5090	<b>22,6%</b> (12,7–36,5%)	<b>90,0%</b> (72,3–97,4%)	<b>80,0 %</b> (51,3–93,7%)	<b>39,7%</b> (28,3–52,3%)	
NfL (pg/ml)	2330*	<b>84,9%</b> (71,9–92,8%)	<b>70,0 %</b> (50,4–84,6%)	<b>83,3%</b> (70,2–91,6%)	<b>72,4%</b> (52,5–86,5%)	<b>0,768</b> (0,621–0,862)
90% senzitivita	1650	<b>90,6%</b> (78,6–96,5%)	<b>53,3 %</b> (34,6–71,2%)	<b>77,4%</b> (64,7–86,7%)	<b>76,1%</b> (52,4–90,9%)	
90% specifická	7610	<b>30,2%</b> (18,7–44,5%)	<b>90,0%</b> (72,3–97,4%)	<b>84,2%</b> (59,5–95,8%)	<b>42,2%</b> (30,2–55,1%)	

\* Diagnostická mez získaná na základě nejvyšší hodnoty Youdenova J-indexu pro danou ROC křivku. PPH – pozitivní prediktivní hodnota; NPV – negativní prediktivní hodnota; AUC – area under the curve / plocha pod křivkou; IS – interval spolehlivosti. Interval spolehlivosti pro AUC byl vypočítán dle DeLongovy metody variance. Intervaly spolehlivosti pro senzitivitu a specifickou byly vypočítány pomocí 2000 stratifikovaných opakování bootstrapových výběrů.



V situaci, kdy bylo na základě hladin neurofilament cílem, odlišit podskupinu (fenotyp) ALS-SMN, dosahovala hladina p-NfH (AUC 0,848, IS 0,671-0,934) i NfL v likvoru (AUC 0,838, IS 0,694–0,981) velmi dobrou diagnostickou sílu (Tab. 17a, Obr. 12, 13). V případě NfL v likvoru byla ovšem diagnostická síla tohoto biomarkeru pro odlišení ALS-SMN od neurologických kontrol statisticky významně nižší než v situaci, kdy cílem bylo odlišit ostatní fenotypy ALS od neurologických kontrol (ALS-spinální + ALS-B; n =56; AUC 0,995, IS 0,981-0,999; srovnání AUC mezi dvěma ROC křivkami: p = 0,032). Při identickém srovnání diagnostické síly p-NfH v likvoru v tomto ohledu již nebyl nalezen signifikantní rozdíl (AUC 0,968, IS 0,920-0,987; srovnání AUC mezi dvěma ROC křivkami: p = 0,064). Na základě hladin p-NfH v séru nebylo možné, spolehlivě diskriminovat pacienty se skupin ALS-SMN vůči pacientům z kohorty neurologických kontrol (AUC 0,457, IS 0,254-0,661). Dále jsme stanovili diagnostické meze: pro p-NfH v likvoru činila hodnota, stanovená dle Youdenova J-indexu 605 pg/ml a test dosáhl senzitivitu 80 (IS 60,0-95,7) % a specifitu 81 (IS 71,4-90,5)%; PPH činila 50 (IS 34,5-84,7)% a NPH 94,4 (IS 82,1-97,2) %. Při stanovení diagnostické meze na základě cílové senzitivity 90 % činila její hodnota 535 pg/ml a test dosahoval specifitu 66,7 (IS 71,4-90,5) %. Diagnostická mez pro cílovou specifitu 90% byla stanovena na 727 pg/ml a test dosáhl senzitivitu 66,7 (IS 38,4-88,2) %, PPH 62,5 (IS 41,9-86,1) % a NPH 92,1 (IS 78,0-97,0) %. V případě hladiny NfL v likvoru byla na základě Youdenova J-indexu určena diagnostická mez 2170 pg/ml a test dosahoval senzitivitu 60 (IS 33,3–86,7) %, specifitu 100 (IS 94,3-100) %, PPH 100 (IS 70,3-100) % a NPH 91,4 (IS 76,9-100) %. Diagnostická mez pro cílovou senzitivitu 90 % činila 800 pg/ml a test dosahoval specifitu 68,3 (IS 55,3-79,3) %. Pro cílovou specifitu 90 % byla hodnota diagnostické meze 1216,5 pg/ml a test dosahoval senzitivitu 66,7 (CI 46,5-86,7) %. Stran optimální diagnostické meze jsme vycházeli z potřeby konfirmačního testu, tedy s preferovanou maximální specifitou. Pro modelovou situaci odlišení ALS-SMN od neurologických kontrol činila diagnostická mez p-NfH v likvoru 727 pg/ml a pro NfL v likvoru 2170 pg/ml, a to na základě maximální dosažené specifity a pozitivní prediktivní hodnoty testu při současně akceptovatelné senzitivě a negativní prediktivní hodnotě. S ohledem na fakt, že u ALS-SMN podskupiny bylo zároveň 7 (46,6 %) pacientů se současnou vícečetnou radikulární kompresí, provedli jsme analýzu diagnostické síly obou neurofilament v likvoru pro odlišení pacientů z ALS-SMN vůči oběma kontrolním kohortám současně (n = 93). V této analýze ale nebylo možné, dosáhnou hodnoty diagnostické meze, která by nevedla buď k neakceptovatelné ztrátě senzitivity, nebo specifity a zároveň byla ve všech variantách výsledkem zcela

neakceptovatelná pozitivní prediktivní hodnota testu (Tab. 17b). Z tohoto důvodu jsme pro dané srovnání aplikovali diagnostické meze, získané při analýze celého souboru vůči oběma kontrolním kohortám, tzn. pro p-NfH v likvoru hodnotu 1205 pg/ml a pro NfL 2180 pg/ml. Při daných diagnostických mezích bylo 8 (53,3 %), resp. 6 (40 %) pacientů ze skupiny ALS-SMN testem označeno jako falešně negativní.

**Tab. 17** Výsledky ROC analýzy při diskriminaci mezi pacienty

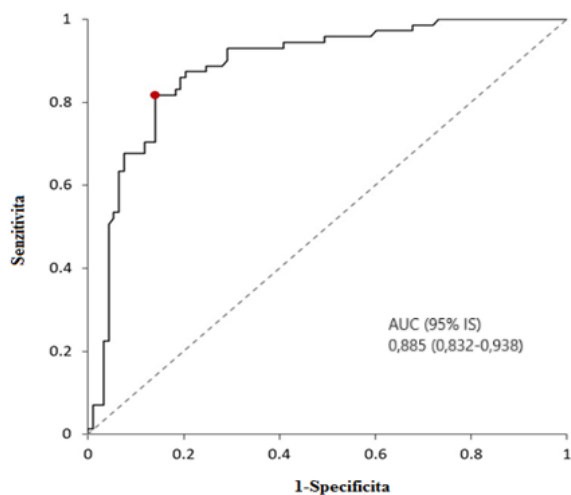
**a) ALS-SMN (n=15) a kohortou neurologických kontrol (n = 63)**

<b>Parametr</b>	<b>Diagnost. mez</b>	<b>Senzitivita (95% IS)</b>	<b>Specificita (95% IS)</b>	<b>PPH (95% IS)</b>	<b>NPH (95% IS)</b>	<b>AUC (95% IS)</b>
p-NfH (pg/ml), likvor	605*	<b>80,0%</b> (60,0–95,7%)	<b>81,0%</b> (71,4–90,5%)	<b>50,0%</b> (34,5–84,7%)	<b>94,4%</b> (82,1–97,2%)	<b>0,848</b> (0,671–0,934)
90% senzitivita	535	<b>86,7%</b> (59,5–98,3%)	<b>66,7%</b> (71,4–90,5%)	<b>37,9%</b> (26,4–85,0%)	<b>95,5%</b> (82,6–97,4%)	
90% specificita	727	<b>66,7%</b> (38,4–88,2%)	<b>90,5%</b> (82,5–96,8%)	<b>62,5%</b> (41,9–86,0%)	<b>92,1%</b> (78,0–97,0%)	
NfL (pg/ml)	2170*	<b>60,0%</b> (33,3–86,7%)	<b>100 %</b> (94,3–100%)	<b>100%</b> (70,3–100%)	<b>91,4%</b> (76,9–100%)	<b>0,838</b> (0,694–0,981)
90% senzitivita	800	<b>87,7%</b> (59,5–98,3%)	<b>68,3%</b> (15,9–36,5%)	<b>39,4%</b> (29,3–85,6%)	<b>94,2%</b> (83,0–97,5%)	
90% specificita	1216.5	<b>66,7%</b> (46,5–86,7%)	<b>90,5%</b> (82,5–96,8%)	<b>62,5%</b> (41,9–86,1%)	<b>92,1%</b> (78,0–97,0%)	

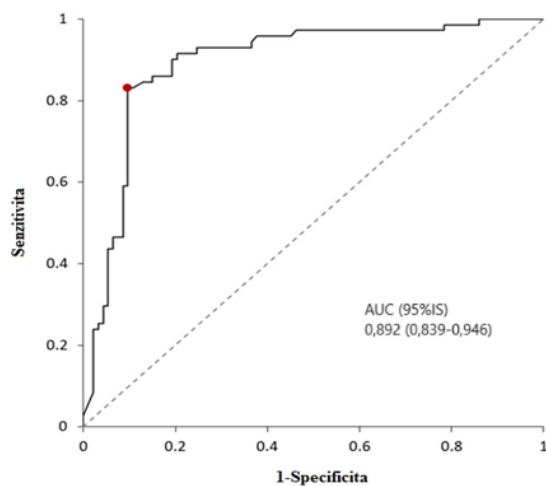
**b) ALS-SMN (n = 15) a neurologickými kontrolami + myelo-/radikulopatiemi**

<b>Parametr</b>	<b>Diagnost. mez</b>	<b>Senzitivita (95% IS)</b>	<b>Specificita (95% IS)</b>	<b>PPH</b>	<b>NPH</b>	<b>AUC (95% IS)</b>
p-NfH (pg/ml), likvor	607,5*	<b>80,0%</b> (60,0–100%)	<b>71,0%</b> (61,3–79,6%)	<b>30,8%</b>	<b>95,6%</b>	<b>0,776</b> (0,652–0,900)
90% senzitivita	292	<b>93,3%</b> (80,0–100%)	<b>32,3%</b> (22,6–41,9%)	<b>18,2%</b>	<b>96,8%</b>	
90% specificita	2101,5	<b>33,3%</b> (13,3–60,0%)	<b>90,3%</b> (83,7–95,7%)	<b>35,7%</b>	<b>89,4%</b>	
NfL (pg/ml)	2180*	<b>60%</b> (33,3–86,7%)	<b>90,3%</b> (100–100%)	<b>50,0%</b>	<b>93,3%</b>	<b>0,754</b> (0,609–0,900)
90% senzitivita	475	<b>93,3%</b> (80,0–100%)	<b>21,5%</b> (14,0–30,1%)	<b>16,1%</b>	<b>95,2%</b>	
90% specificita	2180	<b>60%</b> (33,3–86,7%)	<b>90,3%</b> (100–100%)	<b>50,0%</b>	<b>93,3%</b>	

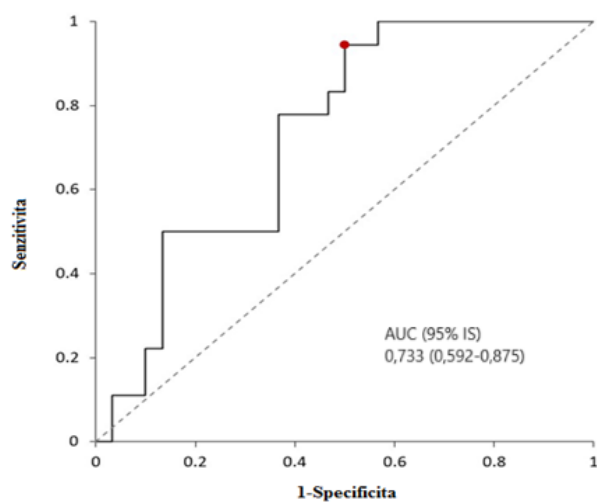
Vysvětlivky viz jako Tab. 15 a Tab. 16



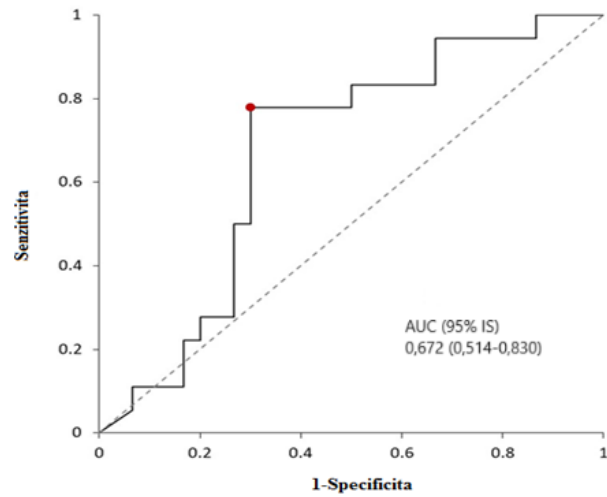
**Obr. 8** ROC křivka p-NfH (likvor; pg/ml): ALS x myelo/radikulopatie a neurol. kontroly



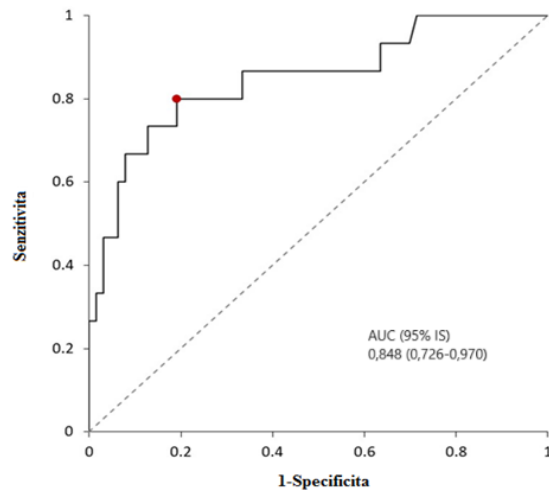
**Obr. 9** ROC křivka NfL (likvor; pg/ml): odlišení ALS x komprese a neurol. kontrol



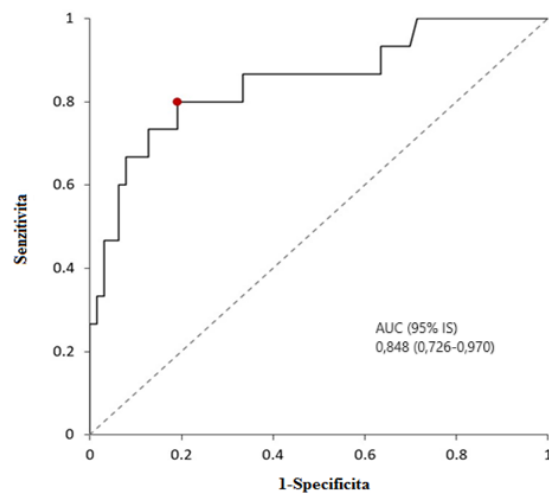
**Obr. 10** ROC křivka p-NfH (likvor; pg/ml): odlišení ALS-kompresie od myelo/radikulopatií



**Obr. 11** ROC křivka NfL (likvor; pg/ml): odlišení ALS-komprese od myelo/radikulopatií



**Obr. 12** ROC křivka p-NfH (likvor; pg/ml): odlišení ALS-SMN od neurol. kontrol



**Obr. 13** ROC křivka NfL (likvor; pg/ml): odlišení ALS-SMN od neurologických kontrol

## **4.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS**

### **4.2.1. Varianty s kauzálním významem pro rozvoj ALS**

U 15 pacientů (17 %) z celého souboru jsme detekovali 15 patogenních, nebo pravděpodobně patogenních variant (Obr. 14), přičemž nejčastěji se jednalo o HRE v *C9orf72*, nalezenou u 12 jedinců (13,5 % všech pacientů, zařazených do studie – 6 mužů, 6 žen). U šesti pacientů s průkazem HRE v *C9orf72* byla dokumentován familiární výskyt ALS nebo FTD, u dalších šesti pacientů ale byl výskyt v rámci rodiny sporadický. U dalších tří pacientů s průkaznou patogenní, nebo pravděpodobně patogenní variantou se jednalo o mutace v genech *FUS*: p.(Arg521Cys), *TARDBP*: p.(Ala382Thr) a nakonec *TBKI* (splice donor c.540+1G>T). Detekované varianty v genech *FUS* a *TARDBP* již byly popsány a jsou dokumentovány v databázi ClinVar jako patogenní, resp. pravděpodobně patogenní, bez rozporujících nálezů. Sestřihová varianta v genu *TBKI* již rovněž byla zaznamenána v rámci jedné studie, ale klinický fenotyp u této konkrétní varianty nebyl popsán (Cirulli ET. et al., 2015).

#### **4.2.1.1. Klinické znaky, asociované s patogenními variantami**

##### **4.2.1.1.1 Familiární versus sporadické formy onemocnění**

U osmi z devíti pacientů s familiární formou ALS (88,9 %) jsme prokázali kauzální variantu, přičemž nejčastěji se jednalo o expanzi repetice v genu *C9orf72* (6 z 9 pacientů s fALS; 66,7 %). U dalších dvou pacientů s fALS se jednalo o varianty ve *FUS* a *TARDBP* genech. U pacienta s variantou p.(Arg521Cys) ve *FUS* jsme byli schopni získat archivovaný vzorek DNA jeho již zesnulého bratra, u kterého rovněž byla diagnostikována ALS. Následná analýza potvrdila u tohoto bratra identickou variantu ve *FUS*. Pro variantu v *TARDBP*, detekovanou u jedné pacientky z našeho souboru, jsme nebyli schopni potvrdit její společnou segregaci s fenotypem u ostatních rodinných příslušníků, jelikož již byli všichni déle mrtví a žádný vzorek DNA nebyl k dispozici. Ve skupině pacientů se sporadickou formou ALS (n = 79) jsme detekovali patogenní, nebo pravděpodobně patogenní variantu u sedmi pacientů (8,86 %), opět se nejčastěji jednalo o HRE v *C9orf72* (šest pacientů, 7,55% skupiny sALS). U zbylého pacienta se s ALS se jednalo o výše zmíněnou variantu v *TBKI*.

##### **4.2.1.1.2. Pacienti s časným rozvojem ALS**

U 24 pacientů našeho souboru (27,3 %) došlo k manifestaci onemocnění před 45. rokem života; v rámci této podskupiny byla kauzální varianta prokázána pouze u dvou jedinců, u

kterých se jednalo o familiární formu onemocnění (u obou detekována HRE v *C9orf72*). U zbylých pacientů se sporadickou formou nemoci nebyla žádná patogenní, ani pravděpodobně patogenní varianta zachycena. U pacientů se standardním věkem rozvoje sporadické formy ALS byla naopak kauzální varianta detekována u sedmi jedinců (z celkového počtu 57; 12,3 %). Pozorovaný rozdíl ve frekvenci záchytu kauzálních variant mezi těmito dvěma podskupinami (sALS s časným rozvojem vs. se standardním rozvojem onemocnění) nebyl ovšem statisticky významný ( $p = 0,181$ ).

#### 4.2.1.1.3. Bulbární versus spinální region rozvoje

Zaměřili jsme se na unifaktoriální srovnání regionu rozvoje jako možného klinického prediktoru záchytu kauzální mutace; poté, co jsme vyloučili z analýzy familiární formy, pozorovali jsme záchyt patogenní či pravděpodobně patogenní varianty u pěti ze 17 pacientů s bulbárním regionem rozvoje sALS (29,4 %, u všech detekována HRE v *C9orf72*). U pacientů se spinálním regionem rozvoje sALS byla kauzální varianta detekována u dvou ze 62 (2,55 %, u jednoho záchyt HRE v *C9orf72*, u druhého varianta v *TBK1*). Frekvence záchytu kauzálních variant byla u skupiny s bulbárním regionem rozvoje statisticky signifikantně vyšší ( $p = 0,004$ ). V další analýze jsme se zaměřili na posouzení asociace HRE v *C9orf72* s manifestací v podobě bulbárního regionu rozvoje, která byla dokumentována u sedmi z 12 pacientů s touto variantou (58,3 %). Ve zbytku studijní populace byl bulbární region rozvoje dokumentován u 13 ze 76 pacientů (17,1 %). Pozorovali jsme tedy statisticky významně častější rozvoj onemocnění v bulbárním regionu u nosičů HRE v *C9orf72* oproti zbylé studijní populaci ( $p = 0,005$ ).

#### 4.2.1.1.4. Frontotemporální demence

V rámci celé studijní populace naplnilo sedm pacientů kritéria pro diagnózu FTD (7,95 %); u všech se jednalo o sporadickou formu nemoci. U tří pacientů s FTD (42,9 %) jsme detekovali kauzální variantu (u všech tří se jednalo o HRE v *C9orf72*); u všech tří pacientů se kromě kognitivních symptomů onemocnění manifestovalo v bulbárním regionu. U dalšího jednoho pacienta s FTD byla detekována varianta nejasného významu v genu *KIF5A* (viz další oddíl). Přítomnost FTD byla při srovnání se zbytkem studijní populace se sporadickou formou ALS ( $n = 72$ ; u 4/72 kauzální varianta, 5,6 %) statisticky signifikantně častěji asociována se záchytem patogenní mutace ( $p = 0,013$ ). Četnost výskytu FTD u nosičů HRE v *C9orf72* (3/12, 25%) nebyla statisticky signifikantně vyšší, než u zbytku celé studijní populace (4/76, 5,3 %) ( $p = 0,05$ ).

Charakteristika pacientů		Gen	Typ dědičnosti	Referenční sekvence	DNA varianta	Změna v proteinu	Allelická frekvence gnomAD v2.1.1	dbSNP	ACMG kritéria	ACMG klasifikace	ClinVar	Poly Phen-2	SIFT	CADD	Splice AI
Pohlaví	Věk při vzniku	Subtyp ALS	fALS												
Ž	64	Bulbární + FTD	Ne	C9orf72	AD	NG_031977.1 (G4C2) > 50	N/A			Patogenní	Patogenní	N/A	N/A	N/A	N/A
Ž	41	Bulbární	Ano												
M	61	Bulbární + FTD	Ne												
M	65	Bulbární	Ne												
Ž	69	Bulbární + FTD	Ne												
M	42	Spinální	Ano												
M	57	Bulbární	Ano												
Ž	64	Spinální	Ne												
M	57	Bulbární	Ne												
Ž	55	Spinální	Ano												
Ž	47	Spinální	Ano												
M	46	Spinální	Ano												
M	57	Spinální	Ano	FUS	AD	NM_004960.4 c.1561C>T	p.(Arg521Cys) 1.4 e-5	rs121909668	PS4 <sup>str</sup> , PM2 <sup>mod</sup> , PM5 <sup>mod</sup> , PM1 <sup>mod</sup> , PP5	Patogenní	Patogenní	U (0.94)	D (0)	24,1	U (0.12)
Ž	68	Spinální	Ano	TARDBP	AD	NM_007375.4 c.1144G>A	p.(Ala382Thr) 3 e-5	rs367543041	PS4 <sup>str</sup> , PS3 <sup>sup</sup> , PM1 <sup>mod</sup> , PP2 <sup>sup</sup> , PM2 <sup>mod</sup> , PP5	Patogenní	Patogenní	B (0.27)	B (0.23)	20,7	B (0)
M	66	Spinální	Ne	TBK1	AD	NM_013254.4 c.540+1G>T NG_046906.1 g.20024G>A	N/A		PVS1 <sup>str</sup> , PM2 <sup>mod</sup>	Pravděpod. Patogenní	-	N/A	N/A	N/A	D (1)

Všechny uvedené varianty jsou v heterozygotním stavu; AD – autozomálně dominantní, fALS – familiární ALS; M – muž, Ž – žena; Allelické frekvence v gnomAD v2.1.1 ukazují agregovanou frekvenci, uvedenou v databázi „The Genome Aggregation Database“; dbSNP – databáze „Single Nucleotide Polymorphism Database“ – uvedeno je identifikační číslo dané varianty v této databázi; ACMG kritéria - ACMG, „The American College of Medical Genetics and Genomics“ (Americká společnost pro lékařskou genetiku a genomiku); ClinVar – veřejná databáze záznamů o vztahu variant v lidské DNA a příslušných pozorovaných fenotypů, včetně důkazů; PolyPhen-2 – automaticky predikční nástroj, odhadující dopad příslušné změny aminokyseliny na strukturu a funkci daného lidského proteinu; SIFT – algoritmus „The Sorting Intolerant from Tolerant“ (Třídění tolerantního od netolerovatelného) predikuje efekt exonových variant na funkci proteinu; CADD – nástroj „The Combined Annotation Dependent Depletion“ (Kombinovaná anotace v závislosti na deplici) kvantifikuje míru škodlivosti jednotlivých polymorfismů, resp. vícečetných záměn nukleotidů v genomu; SpliceAI – algoritmus predikce sestřihových variant mRNA na základě strojového učení umělé inteligence; D – deleterious (škodlivý); U – uncertain (nejistého významu); B - benigní; N/A – nelze aplikovat; ACMG kritéria: úroveň zhodnocení patogenicity: vstr - very strong (velmi silná úroveň důkazu), str – strong (silná úroveň), sup – supporting (podporující), mod – moderate (střední úroveň důkazu);

Obr. 14 Varianty s kauzálním významem pro rozvoj ALS v našem souboru

#### 4.2.1. Varianty s nejasným významem

V studijní populaci jsme dále detekovali 16 vzácných variant nejasného významu u 15 pacientů (Obr. 15). U každé detekované varianty jsme formou literární rešerše konfirmovali, zda se jedná o novou, nebo již dříve zaznamenanou variantu.

Zachytili jsme celkem sedm nových variant (všechny v heterozygotním stavu) u šesti pacientů se sporadickou formou ALS. Varianta p.(Glu254\*) v genu *NEK1* nebyla dosud popsána a jedná se o substituční mutaci typu nonsense, zapříčiňující vznik stop kodonu a vedoucí v důsledku ke ztrátě funkce exprimované bílkoviny (enzym - kináza). S ohledem na fakt, že význam mutací se ztrátou funkce v *NEK1* pro patogenezi ALS je nadále předmětem intenzivní vědecké debaty, která dosud nebyla konkluzivně uzavřena, klasifikovali jsme tuto variantu jako nejasného významu. Dále jsme detekovali dvě nové, dosud nepopsané varianty v genu *SETX*: p.(Phe1599Ser) a p.(Ser2289Pro) u dvou pacientů z našeho souboru (z toho jedna pacientka s časným rozvojem ALS). Obě varianty byly substituce typu missense a na základě predikce *in silico* analýzy byly obě zhodnoceny jako nejasného významu. Další dvě nové varianty typu missense jsme identifikovali u dvou jednotlivých pacientů (oba sALS) v genech *SPAST*: p.(Ser3Phe) a *TBKI*: p.(Met690Thr). Vzhledem ke skutečnosti, že u žádného z jednotlivců nebyla k dispozici parentální DNA, nebylo možné realizovat segreganční analýzu a dále zhodnotit případnou patogenicitu těchto nově zachycených variant.

U jedné z pacientek našeho souboru (časný rozvoj onemocnění, fenotyp s postižením pouze spinálního  $\alpha$ -motoneuronu) jsme detekovali dvě nové varianty současně. Jednalo se o variantu v *SOD1*: p.(Asp126Glu) a variantu v *TARDBP*: p.(Val57Ile). U dané pacientky jsme získali DNA vzorky od obou rodičů pro segreganční analýzu, která odhalila, že nositelem varianty v *SOD1* je zdravý otec pacientky a nositelem varianty v *TARDBP* poté zdravá matka pacientky.

Mimo výše zmíněné nové varianty jsme v našem souboru detekovali devět již dříve popsáných variant (Obr. 15). U dvou pacientů se jednalo o varianty v genu *FIG4* – varianta p.(Ile41Thr) byla opakovaně detekována u pacientů se sporadickou formou ALS (Cady J. et al., 2015; Osmanovic A. et al., 2018) a v databázi ClinVar jsou závěry stran její patogenicity protichůdné („conflicting results“); varianta p.Arg699Cys, detekovaná u jednoho z pacientů našeho souboru (časný rozvoj onemocnění, sporadická ALS) byla popsána u pacientů s familiární formou onemocnění (Müller K. et al., 2018; Tripolszki K. et al., 2019) a hodnocena na základě *in silico* predikce jako nejasného významu. Analogická situace byla u varianty v *UBQLN2*: p.(Pro494Leu), detekované u pacientky se



sALS v našem souboru – tato varianta byla popsána u pacienta s fALS, bez možnosti konfirmace patogenicity segregací analýzou, a tedy zhodnocena jako nejasného významu (Teyssou E. et al., 2017). U další pacientky našeho souboru (sALS, spinální region rozvoje s přidruženou FTD) jsme detekovali recentně popsanou sestřihovou (splice-site) variantu c.291+5G>A v *KIF5A* (Nicholas A. et al., 2018). Zajímavým nálezem (s ohledem na kauzální roli homozygotních variant v tomto genu pro patogenezi hereditární spastické paraplegie) byly dvě detekované heterozygotní varianty typu posunu čtecího rámce (frameshift mutation) v genu *SPG11*: p.(Leu920Thrfs\*10) a p.(Glu1026Argfs\*4) u dvou jednotlivých pacientů.

Pozoruhodné zjištění pak byl průkaz varianty v genu *OPTN* p.(Ser262\*), detekované u dvou příbuzných pacientek v rámci našeho souboru (matka a dcera), u kterých byla zároveň prokázána kauzální HRE v *C9orf72*. U matky se jednalo o sporadickou formu ALS s bulbárním rozvojem s přidruženou FTD; dcera rozvinula bulbární postižení bez průkazných symptomů FTD o dva roky později od nástupu onemocnění u matky. U obou pacientek byla varianta v *OPTN* nalezena v heterozygotním stavu, přičemž její dědičnost byla na základě publikované práce zhodnocena jako autozomálně recesivní (Pottier C. et al., 2018).

Charakteristika pacientů	Gen	Typ dědičnosti	Referenční sekvence	DNA varianta	Změna proteinu	Allelická frekvence gnomAD v2.1.1	dbSNP	ACMG kritéria	ACMG klasifikace	ClinVar	PolyPhen-2	SIFT	CADD	Splice AI		
Ž 59	spinální	Ne	FIG4 <sup>L</sup>	AD	NM_014845.6	c.122T>C	p.(Ile41Thr)	1.0 e <sup>-3</sup>	rs121908287	PM3 <sup>str</sup> , PS3 <sup>sup</sup> , PM2 <sup>mod</sup>	Patogenní	D (1)	D (0)	25,8	B (0)	
M 29	spinální	Ne	FIG4 <sup>L</sup>	AD	NM_014845.6	c.2095C>T	p.(Arg699Cys)	3.54 e <sup>-5</sup>	rs764799053	PM2 <sup>mod</sup> , PP3 <sup>sup</sup>	Nejistý	U (0.96)	D (0)	33	B (0.01)	
Ž 59	Spinální + FTD	Ne	KIF5A	AD	NM_004984.4 NG_088155.1	c.291+5G>A g.18635G>A c.1084-	N/A	1.2 e <sup>-5</sup>	rs775732465	PM2 <sup>mod</sup> , PP3 <sup>sup</sup>	Nejistý	N/A	N/A	N/A	M (0.33)	
M 50	Bulbární	Ne	NEFH <sup>S</sup>	AD	NM_021076.4 NG_008404.1	3C>G g.10529C>G	N/A	1.2 e <sup>-5</sup>	rs1347201784	PM2 <sup>mod</sup> , PP3 <sup>sup</sup>	Nejistý	-	N/A	N/A	S (0.55)	
M 59	Bulbární	Ne	NEK1 <sup>S</sup>	AD	NM_001199397.3	c.760G>T	p.(Glu254*)	0	-	PVS1 <sup>mod</sup> , PM2 <sup>mod</sup>	Nejistý	-	N/A	N/A	S (0.55)	
Ž*	Bulbární + FTD	Ne	OP7N	AR	NM_001008212.2	c.785C>A	p.(Ser262*)	1.42 e <sup>-5</sup>	rs750571210	PM3 <sup>str</sup> , PVS1 <sup>str</sup> , PM2 <sup>mod</sup> , PP5	Patogenní	Patogenní	N/A	N/A	N/A	B (0)
Ž*	Bulbární	Ne	OP7N	AR	NM_001008212.2	c.785C>A	p.(Ser262*)	1.42 e <sup>-5</sup>	rs750571210	PM3 <sup>str</sup> , PVS1 <sup>str</sup> , PM2 <sup>mod</sup> , PP5	Patogenní	Patogenní	N/A	N/A	N/A	B (0)
Ž	Spinální	Ne	SETX <sup>L</sup>	AD	NM_015046.7	c.4796T>C	p.(Phe1599Ser)	0	-	PM2 <sup>mod</sup>	Nejistý	-	D (0.99)	D (0)	26,8	B (0)
M 64	Spinální	Ne	SETX <sup>L</sup>	AD	NM_015046.7	c.6865T>C	p.(Ser2289Pro)	0	-	PM2 <sup>mod</sup>	Nejistý	-	D (0.99)	U (0.025)	24,5	B (0)
Ž**	Jen α-MN	Ne	SOD1	AD/AR	NM_000454.5	c.378C>G	p.(Asp126Glu)	0	-	PM1 <sup>mod</sup> , PP2 <sup>sup</sup> , PM2 <sup>mod</sup> , PM5 <sup>sup</sup> , PP3 <sup>sup</sup>	Pravděpod. patogenní	-	D (0.99)	D (0)	25,5	B (0.03)
Ž	Spinální	Ne	TARDBP	AD	NM_007375.4	c.169G>A	p.(Val57Ile)	0	-	PM2 <sup>mod</sup> , PP2 <sup>sup</sup>	Nejistý	-	B (0.03)	B (0.7)	21	B (0)
Ž	Spinální	Ne	SPAST	AD	NM_014946.4	c.8C>T	p.(Ser3Phe)	0	-	PM2 <sup>mod</sup> , PP2 <sup>sup</sup>	Nejistý	-	D (0.98)	D (0)	23,4	B (0.03)
M 64	Bulbární	Ne	SPG11	AR	NM_025137.4	c.2757_2775 del	p.(Leu920Trpfs*10)	0	rs1595888828	PVS1 <sup>str</sup> , PM3 <sup>str</sup> , PM2 <sup>mod</sup> , PP5	Patogenní	Pravděpod. patogenní	N/A	N/A	N/A	B (0)
M 60	Jen α-MN	Ne	SPG11	AR	NM_025137.4	c.3075dup	p.(Glu1026Agtfs*4)	2.79 e <sup>-5</sup>	rs312262752	PVS1 <sup>str</sup> , PM3 <sup>str</sup> , PM2 <sup>mod</sup> , PP1 <sup>sup</sup> , PP5	Patogenní	Patogenní	N/A	N/A	N/A	B (0.06)
M 29	Spinální	Ne	TBK1	AD	NM_013254.4	c.2069T>C	p.(Met690Thr)	0	-	PM2 <sup>mod</sup>	Nejistý	-	D (0.9)	D (0.1)	24,9	B (0.02)
Ž 70	Bulbární	Ne	UBQLN2	XLD	NM_013444.4	c.1481C>T	p.(Pro494Leu)	0	-	PM2 <sup>mod</sup>	Nejistý	-	B (0.02)	B (0)	22,2	B (0)

Všechny uvedené varianty jsou v heterozygotním stavu; \* označuje 2 příbuzné jedince, matku a dceru – matka byla klasifikována jako sporadická forma ALS v době zařazení do prospektivní kohorty (ad hoc) u dcery se ALS rozvinula až s odstupem 2 let; \*\* označuje jednotlivou pacientku, u které byly detekovány současně 2 varianty (v SOD1 a TARDBP); jen α-MN – fenotyp s izolovaným postižením spinálních motoneuronů; fALS – familiární forma ALS (alespoň 1 přímý příbuzný s ALS a/ nebo FTĐ, Gen – pro daný gen jsou pouze omezené důkazové asociace s ALS; Gen<sup>S</sup> – gen zvýšené susceptibilitě k ALS (nikoliv kauzální); AD – autozomálně dominantní; AR – autozomálně recesivní; XLD – X-vázaný, dominantní typ; Allelické frekvence v gnomAD v2.1.1 ukazují agregovanou frekvenci, uvedenou v databázi „The Genome Aggregation Database“; dbSNP – databáze „Single Nucleotide Polymorphism Database“ – uvedeno je identifikační číslo dané varianty v této databázi; ACMG kritéria - ACMG, „The American College of Medical Genetics and Genomics“ (Americká společnost pro lékařskou genetiku a genomiku); ClinVar – veřejná databáze záznamů o vztahu variant v humánní DNA a příslušných pozorovaných fenotypů, včetně důkazů; PolyPhen-2 – automatický predikční nástroj, odhadující dopad příslušné změny aminokyseliny na strukturu a funkci daného humánního proteinu; SIFT – algoritmus „The Sorting Intolerant from Tolerant“ (Třídění tolerantního od netolerantního) predikuje efekt exonových variant na funkci proteinu; CADD – nástroj „The Combined Annotation Dependent Depletion“ (Kombinovaná anotace v závislosti na deplici) kvantifikuje míru škodlivosti jednotlivých variant nukleotidů a rovněž posunových mutací typu delece i inserce v humánním genu; čím nižší skóre, tím benignější varianta; SpliceAI – algoritmus predikce sestřihových variant mRNA na základě strojového učení umělé inteligence; D – deleterious (škodlivý); U – uncertain (nejistého významu); B - benigní; N/A – nelze aplikovat; ACMG kritéria: úroveň zhodnocení patogenicity: vsf - very strong (velmi silná úroveň důkazu), str - strong (silná úroveň), sup - supporting (podporující), mod - moderate (střední úroveň důkazu).

Obr. 15 Varianty nejasného významu pro rozvoj ALS v našem souboru

## 5. DISKUZE

### 5.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS

Nakolik je nám známo, naše práce byla první publikovanou studií, která cíleně analyzovala diagnostickou efektivitu stanovení hladin neurofilament v tělesných tekutinách u specifických podskupin pacientů s ALS v situaci, kdy panuje reálná diagnostická nejistota v důsledku buď přítomnosti fenotypové varianty onemocnění (izolované projevy postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu), nebo v důsledku radiologického nálezu, implikujícího možnou kompresivní etiologii neurologického deficitu.

V rámci celé studijní populace byla diagnostická síla hladin p-NfH i NfL v likvoru za účelem odlišení pacientů z kohorty všech ALS od pacientů z ostatních dvou kohort průkazně velmi dobrá. V situaci, kdy jsme porovnání omezili pouze na pacienty z kohort ALS a neurologických kontrol, diagnostická síla obou řetězců neurofilament v likvoru dále signifikantně vzrostla a dosahovala vynikajících hodnot. Zároveň se hodnoty diagnostických mezí, stanovených při odlišení ALS pouze od neurologických kontrol, velmi významně přibližovaly hodnotám, které publikovali ostatní autoři, v jejichž pracích byla skladba skupin neurologických kontrol srovnatelná s naší prací (Poesen K. et al., 2017; De Sheapdryver M. et al., 2018; Steinacker P. et al., 2016). Z výše uvedeného srovnání je zjevný vliv kohorty pacientů s kompresivní myelo-/radikulopatií, kteří vykazovali signifikantně vyšší hladiny obou neurofilament v likvoru oproti pacientům ze skupiny neurologických kontrol, na výslednou diagnostickou sílu těchto testů. Kromě významného snížení diagnostické síly jsme při analýze, ve které byla zařazena i kohorta myelo-/radikulopatií, pozorovali nárůst hodnot diagnostických mezí pro hladiny neurofilament v likvoru (např. pro p-NfH hodnoty 840 pg/ml na hodnotu 1205 pg/ml), resp. snížení pozitivní prediktivní hodnoty testu (např. pro p-NfH v likvoru z 92,5 %, IS /82,7–97,2/ % na 81,7 %, IS /78,5–92,5/ %). Vycházíme-li z předpokladu, že elevace hladin neurofilament neodráží procesy, specifické pro jednotlivé etiopatogenetické jednotky, lze pozorovanou asociaci kohorty myelo-/radikulopatií s vyššími hladinami neurofilament v likvoru (ve srovnání s neurologickými kontrolami) pravděpodobně nejlépe vysvětlit větším rozsahem a významně rychlejší dynamikou obecné axonální léze u kompresí podmíněných jednotek. Tuto hypotézu klíčového vlivu rozsahu a dynamiky rozvoje axonální léze podporuje naše vlastní pozorování, kdy jsme dokumentovali signifikantně vyšší hladiny obou neurofilament v likvoru u akutních myelopatií ve srovnání s chronickými, ale i u podskupiny pluriradikulopatií ve srovnání s monoradikulopatiemi.

Tyto rozdíly mezi podskupinami v rámci kompresí podmíněných etiologií jsou rovněž v souladu s pozorováním ostatních autorů, kteří zkoumali hladiny neurofilament u myelopatií, resp. radikulopatií (Ohya Y. et al., 2015; Takahashi H. et al., 2018). Na druhou stranu, kohorta neurologických kontrol sestávala převážně z chronicky probíhajících jednotek, postihujících predominantně periferní nervový systém, popř. z chronických, predominantně demyelinizačních polyradikuloneuropatií; u všech těchto jednotek je rozsah, resp. dynamika rozvoje axonální léze významně nižší. Všechny tyto výše uvedené poznatky, získané na našem souboru, poté potvrzují popisované obtíže při snaze o dosažení jednotných diagnostických mezí pro hladiny neurofilament, jsou-li odvozovány z různých souborů s odlišně strukturovanou populací kontrol (Oeckl P. et al., 2016). Jsou-li do kontrolních kohort zahrnuty etiologické jednotky s obecně velkým rozsahem axonální léze (záněty CNS, vaskulární, traumatické kompresivní léze aj.), u kterých rovněž dochází k významné elevaci hladin neurofilament v tělesných tekutinách, dojde k výraznému ovlivnění hodnot diagnostických mezí (Rossi D. et al., 2018; Witzel S. et al., 2022).

Co se týče hladin p-NfH v séru, diagnostická síla tohoto testu byla statisticky významně nižší, než pro p-NfH, resp. NfL v likvoru a celkově byla klasifikována jako pouze dostatečná („poor“). Hlavním argumentem pro metodu, založenou na stanovení hladiny neurofilament v krvi, je významně nižší invazivita krevního odběru a tím pádem širší všeobecná dostupnost, tzn. např. i v režimu ambulantních vyšetření, bez nutnosti hospitalizace pacienta za účelem provedení lumbální punkce. Na druhou stranu, likvorový kompartment velmi pravděpodobně mnohem více bezprostředně reflektuje základní patofyziologické děje v CNS. Naším cílem bylo proto zhodnotit, jak hladina p-NfH v séru koreluje s hladinou v likvoru a do jaké míry by mohla být sérová hladina využita jako její zástupný ukazatel. Vyšetření p-NfH v séru jsme realizovali za pomoci komerčně dostupné ELISA soupravy, certifikované pro využití k humánní in vitro diagnostice, jelikož tato metoda představuje široce dostupné řešení pro rutinní laboratorní diagnostiku, na rozdíl od výzkumných metod, dostupných pouze v rámci akademických pracovišť. Zároveň jsme vycházeli z publikovaných slibných výsledků skupiny, která využila identickou ELISA soupravu (De Schaepdryver M. et al., 2018) a naším cílem bylo reprodukovat tyto nálezy. Co se týče konkrétní volby pouze p-NfH a nikoliv NfL pro analýzu ze séra, zde jsme vycházeli z publikovaných výsledků, deklarujících nedostatečnou senzitivitu dostupných ELISA souprav pro kvantifikaci NfL v séru (Kuhle J. et al., 2016). V rámci stanovení hladin NfL v séru mezitím zaujala jednoznačně superiorní roli ultrasenzitivní,

digitalizovaná imunoanalytická metoda SiMoA (Single-Molecule Array) s více než 100x vyšší detekční mezí pro hladiny NfL v séru ve srovnání s ELISA soupravami (Kuhle J. et al., 2016). Ačkoliv tato metoda (SiMoA) byla navržena jako zlatý standard pro vyšetření hladin NfL v séru, její vysoká pořizovací i provozní cena a zároveň certifikace pouze pro výzkumné účely významně limituje její širší dostupnost a praktickou aplikovatelnost. I s ohledem na naše limitované finanční prostředky jsme proto v rámci našeho souboru stanovili pouze hladiny p-NfH v séru. Co se týče korelace hladin p-NfH v séru a likvoru, pozorovali jsme významnou pozitivní korelaci, která byla v rámci celého souboru silná ( $\tau_b = 0,357$ ,  $p = 0$ ), ale ve srovnání s korelací mezi hladinami p-NfH a NfL v likvoru ( $\tau_b = 0,684$ ,  $p = 0$ ) významně nižší. Diagnostická síla, kterou jsme pro p-NfH v séru stanovili v našem souboru, je ve srovnání s některými jinými, obdobně navrženými průřezovými studii znatelně nižší (De Shaepdryver M. et al., 2018; Halbgebauer S. et al., 2022); na druhou stranu koresponduje s výsledky jiné studie (Wilke C. et al., 2019). Pravděpodobným vysvětlením by mohla být odlišná skladba naší ALS kohorty co do délky trvání nemoci ve srovnání se studii, které dospěly k vyšší diagnostické síle tohoto testu. Argumenty pro toto vysvětlení poskytuje práce, jejíž autoři zkombinovali metodu průřezového a longitudinálního prospektivního měření hladin p-NfH v plazmě a dokumentovali vysokou inter-, ale rovněž intraindividuální variabilitu hladin p-NfH v čase u jednotlivých pacientů (Lu CH. et al., 2015). Tuto variabilitu signifikantně determinovala fáze nemoci, kdy v pozdějších fázích byly pozorovány významně nižší hladiny p-NfH ve srovnání s iniciálním měřením. Autoři této publikace prokázali, že důvod variability spočívá v nárůstu titru protilátek proti p-NfH v krvi v čase a jeho následné (protilátkově zprostředkované) agregaci (a tím pádem ke snižování hladin). Vliv na oba typy (inter- i intraindividuální) variability stanovených hladin měla i na protilátkách nezávislá, analytickou metodou podmíněná, kolísající míra agregace p-NfH (vliv reakční matrix). Autoři této studie zhodnotili na základě výše uvedených argumentů výsledky průřezového měření hladin p-NfH v plazmě jako nespolehlivé.

V souhrnu všech výše uvedených poznatku lze tedy argumentovat, že přínos stanovení hladin p-NfH v séru s využitím aktuálně dostupných ELISA souprav se jeví být limitovaný a nedostatečně spolehlivý k uvedení do rutinní klinické praxe.

Sekundárními cíli naší práce bylo zhodnotit klinické ukazatele, ovlivňující hladiny neurofilament. Ačkoliv v kohortě pacientů s ALS nebyl prokázán signifikantní vliv věku, resp. pohlaví, v obou kontrolních kohortách tyto dva faktory (věk, resp. mužské pohlaví)

signifikantně pozitivně korelovaly s hladinami obou neurofilament a jejich efekt byl nezávislý na ostatních kovariantách. Toto pozorování je plně v souladu s metaanalýzou studií, hodnotících determinanty hladin NfL (Bridel C. et al., 2019), resp. se studii, zaměřenými na hladiny p-NfH v likvoru (Rossi D. et al., 2018, Steinacker P. et al., 2016). Co se týče pacientů s ALS, pozorovali jsme dvě klíčové determinanty hladin NfL a p-NfH v likvoru: (1) klinický fenotyp (izolované postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu jako model limitovaného rozsahu axonální léze) a (2) rychlost progresu nemoci (hodnota  $\Delta$  FS; tedy dynamika procesu). I předchozí publikované studie referovaly významný vliv fenotypu s izolovaným postižením spinálních  $\alpha$ -motoneuronů na hladiny NfL (Gaiani A. et al., 2018), popř. fenotypu s minimálním postižením kortikospinální dráhy na hladiny obou neurofilament v likvoru (Poesen K. et al., 2017). Ačkoliv bychom na základě těchto pozorování mohli spekulovat ohledně korelace mezi hladinami NfL a rozsahem postižení kortikospinálního traktu, tyto hypotézy by bylo nutné ověřit pomocí kvantitativních MRI ukazatelů postižení kortikospinální dráhy (frakční anizotropie, radiální difuzivita) (Menke RA. et al., 2015; Schreiber S. et al., 2018). S ohledem na retrospektivní povahu studie nebylo možné, doplnit kvantitativní MRI analýzu. Hlavním důvodem pro zařazení skupiny pacientů s izolovaným postižením spinálního  $\alpha$ -motoneuronů bylo modelování reálného diferenciálně diagnostického scénáře v časně fázi diagnostického procesu, kdy absence projevů postižení kortikospinální dráhy významně rozšiřuje spektrum potenciálních alternativních etiologií. V této situaci by byl přínos spolehlivého diagnostického biomarkeru ALS nesporný a velmi významný. Zajímavým zjištěním bylo pozorování, že více než polovina pacientů, zařazených iniciálně do této skupiny (ALS-SMN), manifestovala v dalším průběhu onemocnění (s variabilním časovým odstupem) projevy postižení kortikospinální dráhy a naplnila tak diagnostická kritéria klasické formy ALS; zbytek pacientů ze skupiny vykazoval po celou dobu onemocnění pouze izolované projevy postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu a lze je tedy klasifikovat jako variantu PMA. Toto pozorování dokumentuje nedostatečnou spolehlivost fenotypizace pacientů (klasická ALS vs. PMA) v časných fázích onemocnění; v tomto ohledu by tedy rozdílné hladiny neurofilament mohly přispět ke zpřesnění diskriminace mezi danými podtypy pacientů. V našem souboru jsme ovšem nepozorovali významný rozdíl hladin pro žádné z neurofilament mezi těmito podtypy pacientů, což lze pravděpodobně vysvětlit velmi podobnou rychlostí progresu (jako jedné z hlavních determinant hladin Nf) mezi oběma podtypy skupiny ALS-SMN.

Při analýze prognostické hodnoty hladin neurofilament jsme pozorovali silnou pozitivní korelaci mezi NfL a parametrem  $\Delta$  FS. Tento náález je opět v souladu s hypotézou, že hlavními faktory, určujícími míru elevace hladin neurofilament, jsou rozsah a dynamika probíhající axonální léze. Jak hladina NfL, tak parametr  $\Delta$  FS poté významně negativně korelovaly s délkou přežití; v případě  $\Delta$  FS byla ovšem tato korelace silnější. Na základě našich pozorování lze argumentovat, že využití stanovení hladiny NfL v rámci predikce prognózy je spíše komplementární, ale nikoliv superiorní vůči již existujícím nástrojům.

Diagnostická efektivita obou neurofilament v likvoru při odlišení pacientů s izolovaným postižením  $\alpha$ -motoneuronů (ALS-SMN) od neurologických kontrol byla nižší než pro situaci, kdy cílem bylo odlišit pacienty z celé kohorty ALS (od neurologických kontrol). Tento rozdíl byl v případě NfL v likvoru statisticky významný. Ačkoliv pro p-NfH tento rozdíl nedosáhl statistického významu (pravděpodobně vliv malého datového souboru a efektu outliers), přesto se dle našeho zhodnocení jednalo o nezanedbatelný efekt, hlavně s ohledem na prokázané významně nižší hladiny obou neurofilament u podskupiny ALS-SMN ve srovnání s ostatními pacienty s ALS. V důsledku těchto nižších hladin byl pozorován i větší překryv hodnot mezi podskupinou ALS-SMN a kohortou neurologických kontrol. Ačkoliv z perspektivy statistické analýzy dosahovala diagnostická efektivita obou neurofilament pro odlišení ALS-SMN od kohorty neurologických kontrol nadále kategorie velmi dobré síly a diagnostické meze, které jsme pro tuto situaci stanovili v našem souboru, se podobaly hodnotám jiných publikovaných prací (de Shaepdryver M et al., 2018), podrobnější analýza odhalila problematické aspekty z klinického úhlu pohledu. Při zhodnocení pacientů z podskupiny ALS-SMN, kteří byli na základě diagnostických mezi testu označeni jako falešně negativní (5/15, 33,3 % pro p-NfH v likvoru; 6/15, 40% pro NfL v likvoru), splňovali všichni současně kritérium pomalé progresse. Jednalo se tedy o typ pacientů, kteří i v rámci ALS-SMN podskupiny vykazovali statisticky významně nižší hladiny obou neurofilament. U těchto pacientů byla správná diagnóza určena až pomocí extenzivního diferenciatně diagnostického vyšetřovacího procesu, tzn. elektrofyziologického vyšetření (kondukční studie k exkluzi motorických kondukčních bloků, průkaz denervačního-reinervačního syndromu v klinicky nepostižených regionech), laboratorní diagnostiky (vyšetření protilátek proti gangliosidovým antigenům, molekulárně genetické vyšetření trinukleotidové expanze v *AR* genu, resp. homozygotní delece 7 a 8 exonu *SMN1* genu, případně mutace v *HEXA* A genu), resp. klinického monitorování progresse onemocnění v čase. Dále jsme v rámci podskupiny ALS-SMN pozorovali

významnou proporcí pacientů, kteří současně naplnili kritéria radiologického nálezu, suspektního z kompresivní etiologie (46,6 %). Při zhodnocení diagnostické efektivity obou neurofilament k odlišení podskupiny ALS-SMN od obou kontrolních kohort současně jsme poté pozorovali situaci, kdy pozitivní prediktivní hodnoty testu při žádné z diagnostických mezí nepřekročily 50 %. I když jsme aplikovali diagnostické meze, stanovené pro odlišení všech pacientů s ALS od kontrolních kohort, pozorovali jsme 6 (40 %, pro hodnotu p-NfH), resp. 8 (53,3 %, pro hodnotu NfL) falešně negativních pacientů, přičemž všichni zároveň byli pomalí progresoři a u 4 byl pozorován suspektní radiologický nálezn. To činní dle našeho názoru pro tuto konkrétní situaci (odlišení pacientů s fenotypem izolovaného postižení  $\alpha$ -motoneuronů a současným suspektním radiologickým nálezem od prosté kompresivní etiologie) test v podstatě nepřínosný.

V situaci, kdy cílem bylo odlišit všechny pacienty s ALS a současně suspektním radiologickým nálezem od prostých, kompresí podmíněných jednotek, dosahovala hladina p-NfH v likvoru dobrou diagnostickou sílu. Hladina NfL v likvoru a p-NfH v séru v této situaci dosahovaly pouze dostatečnou diagnostickou sílu. Překryv hodnot mezi kohortou ALS-komprese a kohortou myelo-/radikulopatií byl významný a výsledkem byla vysoká proporce falešně pozitivní pacientů z kohorty myelo-/radikulopatií při aplikaci dosažených diagnostických mezí. Zaměřili jsme se rovněž na klinické implikace těchto výsledků: v rámci pacientů ze skupiny myelo-/radikulopatií, kteří podstoupili úspěšnou chirurgickou dekompresi (vedla k prokazatelnému zlepšení neurologických deficitů), test označil 70 % z nich jako falešně pozitivní, tzn. nesprávně jako ALS. Využití testu v dané situaci by tedy zvyšovalo riziko, že těmto pacientům bude nesprávně kontraindikována, popř. zbytečně oddálena efektivní léčba. Na druhé straně, v rámci skupiny ALS-komprese test označil čtyři pacienty jako falešně negativní (22,2 %); dva z těchto čtyř pacientů skutečně podstoupili chirurgickou dekompresi (z celkového počtu pěti ALS pacientů, chirurgicky řešených ještě před iniciálním vyšetřením v našem centru). Správná diagnóza byla u všech pacientů ze skupiny ALS-komprese dosažena pomocí velmi detailní klinicko-radiologické korelace nálezů (absence radikulární bolesti, resp. senzitivního deficitu v příslušném dermatomu; projevy postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu nebo kortikospinálního traktu v regionech, nepostižených kompresí), resp. pečlivým, systematickým EMG vyšetřením (pátrání po projevech diskrétního denervačního – reinervačního syndromu v klinicky nepostižených regionech, bez prokázané komprese nervových struktur). Vezmeme-li v potaz podstatně vyšší prevalenci jednotek s kompresivním postižením nervových struktur



v populaci ve srovnání s případy s ALS a zároveň riziko, které vyplývá z falešné positivity testu (kontraindikace, popř. zbytečné oddálení efektivní léčby), hodnotíme tedy stanovení hladin neurofilament pro daný diferenciálně diagnosticky složitý scénář jako diagnosticky nepřínosné.

Hlavní limitací naší práce byl její retrospektivní design, v důsledku čehož byli do studie zařazení jen ti pacienti s ALS, kteří podstoupili odběr a vyšetření likvoru na Neurologické klinice 2. LF UK a FN Motol. Jednalo se o pouze cca 40 % všech pacientů s diagnózou ALS, kteří byli v daném časovém období vyšetřeni v našem centru; zbylí pacienti byli vyšetřeni pouze ambulantě a vyšetření likvoru u nich již bylo provedeno na jiných pracovištích (a tím pádem již nebylo opakováno). Hlavním důsledkem byl menší počet pacientů ve srovnání s ostatními studii, což bylo nejvíce patrné v cílových podskupinách (fenotyp ALS-SMN, pacienti s ALS a suspektním radiologickým nálezem). Pro případnou confirmaci, nebo vyvrácení našich nálezů tedy považujeme za nezbytné, realizovat prospektivní studii většího rozsahu (ideálně multicentrickou), se záměrným náborem pacientů s ALS a výše popsanými znaky.

## **5.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS**

Nakolik je nám známo, jednalo se o první systematické zhodnocení frekvence variant v širokém souboru genů, asociovaných s patogenezi ALS, ve vzorku českých pacientů. Cílem bylo provést pilotní analýzu v populaci sporadických i familiárních forem onemocnění v České republice, protože tato data dosud nebyla publikována a zcela chybí alespoň základní představa stran vyskytujících se variant, resp. alespoň hrubého odhadu jejich četnosti. Familiární formy ALS byly v našem studijním souboru zastoupeny pravděpodobně ve větší míře (10,1 %), než odpovídá reálné situaci v populaci (podle našich odhadů na základě vzorku 200 pacientů by se spíše mohlo jednat o 5–7 % všech pacientů s ALS); naším cílem ale nebylo realizovat populační studii, nýbrž zmapovat varianty, přítomné v ČR. Pacienty s fALS jsme do naší studie záměrně zařadili v disproporčně velkém počtu, protože u této skupiny lze a priori předpokládat významně vyšší pravděpodobnost detekce kauzální mutace; tento předpoklad se potvrdil vlastním pozorováním, kdy jsme u 8 z 9 pacientů (88 %) prokázali patogenní variantu. Při srovnání z významně většími soubory jiných autorů (Zou ZY. et al., 2017; Müller K. et al., 2018) je zřejmé, že tato míra detekce je nadhodnocená a velmi pravděpodobně nereflektuje situaci v celé české populaci. Na druhou stranu, míra záchyty patogenních variant v našem

souboru sporadických forem ALS (7 ze 79 pacientů, 8,9 %) velmi blízce korespondovala s nálezem z recentní, velmi rozsáhlé studie (vyšetřeno 6013 pacientů se sALS) (van Daele SH. et al., 2023) a mohla by tak adekvátně reprezentovat skutečnou situaci v české populaci.

Nejčastěji detekovanou mutací byla expanze hexanukleotidových repetitiv v genu *C9orf72*, kterou jsme zachytili u 12 pacientů (13,5 %) v rámci celého studijního souboru. Tato data jsou plně v souladu s údaji z ostatních evropských kohort a zároveň prokazují, že jde o predominantní genetickou etiologii i u českých pacientů s ALS. U šesti pacientů s HRE v *C9orf72* nebyl (přes cílené zpětné pátrání) průkazný výskyt ALS, nebo FTD u jiných přímých příbuzných; tato mutace tak představovala zároveň nejčastější zachycenou variantu i mezi sporadickými formami (7,6 %). I tato frekvence velmi blízce korespondovala s údaji z ostatních evropských kohort (Van Daele SH. et al., 2023; Yilmaz R. et al., 2023). Při analýze fenotypu pacientů s HRE v *C9orf72* jsme pozorovali signifikantně častější výskyt rozvoje onemocnění v bulbárním regionu (7 z 12 pacientů, 58,3 %) ve srovnání se zbytkem souboru a zároveň trend k častějšímu výskytu frontotemporální demence (3 ze 12, 25 %), ačkoliv tento rozdíl již nedosahoval statistického významu. Významně častější rozvoj onemocnění v bulbárním regionu byl dokumentován rovněž u dalších, významně větších evropských kohort (Chió A. et al., 2012; Wiesenfarth M. et al., 2023). Z opačné perspektivy, bulbární region rozvoje, resp. přítomnost FTD byly v rámci skupiny sALS signifikantně častěji asociovány s detekcí kauzální mutace ve srovnání se spinálním regionem rozvoje, resp. absencí FTD; to z našeho pohledu činí tyto dva klinické ukazatele relativně vhodnými prediktory detekce kauzální mutace. Na druhou stranu, s ohledem na malý datový soubor je nutné konstatovat, že veškerá pozorování mají pouze malou statistickou sílu a zevšeobecnitelnost těchto závěrů je tak pouze omezená, resp. je nutno k ní přistupovat s opatrností. Všichni pacienti, kteří v našem souboru naplnili kritéria FTD (7 z 88, 7,95 %) trpěli sporadickou formou nemoci; kromě tří zmíněných se záchytem HRE v *C9orf72* jsme u jedné pacientky se spinálním regionem rozvoje ALS a současnou FTD zachytili vzácnou variantu v sestřihovém místě genu *KIF5A*: c.291+5G >A. Tato varianta je v databázi ClinVar hodnocena jako nejasného významu. Ačkoliv varianty v tomto genu byly dosud popisovány jako asociované s rozvojem axonální formy hereditární motorické a senzitivní polyneuropatie (nemoc Charcot-Marie-Tooth typ 2, CMT2), resp. s autozomálně dominantní formou hereditární spastické paraplegie (SGP10), recentní rozsáhlá studie

prokázala asociaci variant v sestřihovém místě *KIF5A* s rozvojem ALS (Nicolas A. et al., 2018). *In silico* analýza námi detekované varianty c.291+5G >A ovšem nepredikovala výslednou změnu sestřihu oproti referenční sekvenci a význam této varianty tak zůstává nejasný.

Skupina pacientů s časným rozvojem onemocnění byla v našem souboru rovněž disproporčně velká (27,3 % pacientů souboru ve srovnání s literární referovanými cca. 10 % populace ALS pacientů) (Turner MR. et al., 2012). Záměrně jsme zařadili větší počet těchto pacientů, přičemž jsme vycházeli z validovaného modelu patogeneze, který predikuje časnější nástup nemoci u forem, podmíněných kauzálními mutacemi (Chió A. et al., 2018); stejně jako z dat rozsáhlé studie, dokumentující dřívější věk rozvoje u nosičů kauzálních mutací (Cady J. et al., 2015). V rozporu s naším záměrem jsme ovšem v rámci této podskupiny nepozorovali častější detekci kauzálních variant ve srovnání s ostatními pacienty (se standardním věkem rozvoje) našeho souboru. Kromě dvou pacientů s fALS, u kterých byla detekována HRE v *C9orf72*, jsme v rámci skupiny s časným rozvojem onemocnění našli pouze pět variant nejasného významu u čtyř pacientů. Konkrétně se jednalo o varianty v genech *FIG4*: p.(Arg699Cys), *SETX*: p.(Phe1599Ser), *SOD1*:p.(Asp126Glu), *TARDBP*: p.(Val57Ile) a *TBKI* p.(Met690Thr). Nebyli jsme v rámci dostupných dat schopni confirmovat patogenicitu těchto variant. Ačkoliv jedno z možných vysvětlení pro nízký záchyt kauzálních variant u této podskupiny je celkově malý datový soubor, tato hypotéza nereflktuje fakt, že přes disproporční velikost skupiny pacientů s časným rozvojem byla míra detekce kauzálních variant ve skupině se standardním věkem rozvoje srovnatelná s velkými evropskými kohortami, resp. převažovala nad záchytností ve skupině s časným věkem rozvoje (ačkoliv tento rozdíl nebyl statisticky významný). Na základě tohoto pozorování lze spekulovat stran vlivu kauzálních genetických faktorů, které ovšem dostupná metodika molekulárně genetického vyšetření nedetekuje. Argumentem pro tuto naši hypotézu jsou nálezy jiné studie, rovněž s disproporčně velkým zastoupením pacientů s časným věkem rozvoje ALS a zároveň nízkou detekcí kauzálních variant v genech, asociovaných s patogenezí ALS, v této skupině (Cooper-Knock J. et al., 2017). Autoři této práce analyzovali výskyt variant v genech, kódujících RNA-vázající proteiny, které dosud nebyly jednoznačně prokázány jako kauzálně spjaté s patogenezí ALS, ale podílejí se významně na funkčních drahách, které jsou v rámci patofyziologie ALS postiženy. Tato práce poskytla důkazy pro oligogenní interakci a synergistický efekt mezi variantami tohoto funkčně asociovaného

souboru genů, obzvláště v rámci podskupiny pacientů s časným rozvojem ALS. Tento druh extenzivní analýzy nebyl v souladu se záměry naší práce, a proto můžeme pouze spekulovat, nakolik se tato hypotéza vztahuje i na naši skupinu pacientů. Tuto hypotézu ovšem považujeme za racionální východisko další případné studie, zamerané na objasnění předpokládané, ale dosud neprůkazné genetické etiologie u podskupiny pacientů s časným rozvojem z našeho souboru.

Mutace v genech *FUS* a *TARDBP* patří, po HRE v *C9orf72*, mezi relativně nejčastěji detekované u pacientů s fALS i sALS (Zou ZY. et al., 2017; Van Daele SH. et al., 2023). V našem souboru jsme detekovali dvě patogenní varianty u dvou pacientů s fALS: p.(Arg521Cys) ve *FUS* a p.(Ala382Thr) v *TARDBP*. Pro danou variantu ve *FUS* byla opakovaně prokázána segregace s fenotypem v rámci postižených rodinných příslušníků (Kwiatkowski TJ. et al., 2009) a rovněž byla experimentálně prokázána její patogenicitu (Lanson NA. et al., 2011). Varianta v *TARDBP* u pacientky našeho souboru byla poprvé popsána na velké kohortě fALS a rovněž sALS pacientů původem ze Sardinie (Chió A. et al., 2011). Dále jsme detekovali novou, dosud nepopsanou variantu v *TARDBP*: p.(Val57Ile) v heterozygotním stavu, kterou jsme klasifikovali jako variantu nejasného významu. Tato varianta byla nalezena u pacientky s časným věkem rozvoje sALS s izolovaným postižením spinálního  $\alpha$ -motoneuronu a díky segregáční analýze jsme určili, že variantu pacientka zdědila od své nepostižené matky. Zajímavým zjištěním ovšem bylo, že u výše jmenované pacientky jsme našli druhou, dosud nepopsanou variantu v heterozygotním stavu, a sice p.(Asp126Glu) v genu *SOD1*, kterou pacientka zdědila od svého nepostiženého otce. Jednalo se o substituční variantu typu missense, která byla zhodnocena jako pravděpodobně patogenní, s autozomálně recesivním typem dědičnosti. Ačkoliv segregáční analýza vyloučila kauzální roli obou jednotlivých variant samostatně, spekulovali jsme ohledně možného synergistického efektu těchto variant v případě, kdy se souběžně vyskytnou u jednoho jedince zároveň. Argumenty pro tuto hypotézu opíráme o pozorování z experimentální studie, prokazující interakci mezi aberantními SOD1 a TDP-43 proteiny, což vede k rozvoji patofyziologických změn, napodobujících ALS (Jeon GS. et al., 2019); zároveň zvažujeme analogii k jiné variantě v *SOD1*: p.(Asp91Ala), u které byla popsána oligogenní interakce (Gentile G. et al., 2021) a rovněž variabilní míra penetrance, resp. rovněž variabilní typ dědičnosti (recesivní i dominantní) (Robberecht W. et al., 1996).

V našem souboru jsme nezachytili žádnou, jednoznačně kauzální variantu v genu *SOD1* u sALS ani fALS pacientů. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je celkově malý počet pacientů v naší studii – frekvence variant v *SOD1* u pacientů se sALS v řádově větších kohortách (van Daele SH. et al., 2023) činí 0.63 %. Absenci kauzální varianty u pacientů se sALS v našem souboru tak lze vysvětlit a priori nízkou statistickou pravděpodobností. Rovněž skupina fALS pacientů v naší studii byla malá a nábor pacientů nepokrýval stejnoměrně všechny geografické regiony ČR. Je velmi pravděpodobné, že regionálně se vyskytují v ČR rodiny s kauzálními variantami v *SOD1* (resp. na základě nepublikovaných dat z osobní komunikace jsou nám tyto případy známy, z metodologických důvodů ovšem nemohli být zařazeny do našeho souboru).

V průběhu poslední dekády řada studií zkoumala případný význam oligogenní dědičnosti, resp. hlavně míru výskytu kauzálních variant ve dvou a více genech, asociovaných s patogenezi ALS, u jednoho jednotlivce současně (van Blitterswijk M. et al., 2012; Leblond CS. et al., 2016; Osmanovic A. et al., 2017; McCann EP. et al., 2020). Nejčastěji je – s ohledem na nejvyšší prevalenci této varianty v evropských populacích – tento fenomén pozorován u HRE v *C9orf72* (van Daele SH. et al., 2023). Jiní autoři argumentují proti významu přidružených variant v ostatních genech, asociovaných s ALS, a přinášejí důkazy, že tyto varianty u případů, podmíněných HRE v *C9orf72*, nemodifikují významně projevy, ani průběh onemocnění (Keogh MJ. et al., 2018; Ross JP. et al., 2020). V našem souboru jsme, kromě již zmíněné pacientky s dvěma variantami v *SOD1* a *TARDBP*, dále pozorovali současný výskyt již popsané, patogenní varianty p.(Ser262\*) v genu *OPTN* v heterozygotním stavu, spolu s HRE v *C9orf72* u dvou příbuzných pacientek (matka a dcera). Pro tuto variantu v *OPTN* byl dosud prokázán pouze autozomálně recesivní typ dědičnosti (Pottier C. et al., 2018). Ačkoliv se fenotyp obou pacientek vzájemně odlišoval (významně mladší věk rozvoje nemoci u dcery oproti matce, přítomnost FTD u matky, nikoliv u dcery), u obou byla prokázána identická skladba genetických variant (v *C9orf72* i v *OPTN*). Z tohoto důvodu se detekovaná varianta v *OPTN* spíše nejeví být významným genetickým modifikátorem u těchto dvou pacientek.

Dále jsme detekovali novou variantu v genu *NEK1*: p.(Glu254\*) u pacienta se sALS s bulbárním rozvojem. Pro tuto variantu *in silico* analýza predikuje efekt ztráty funkce (LoF – loss-of-function). Gen *NEK1* kóduje enzym NIMA-asociovaná kináza, jehož hlavní význam pro patogenezi ALS pravděpodobně tkví v řízení procesu stabilizace mikrotubulárního cytoskeletu a dále v regulaci nukleo-cytoplazmatického transportu

v motorických neuronech. Varianty LoF v genu *NEK1* vedou prokazatelně k narušení těchto dějů (Mann JR. et al., 2023). Někteří autoři hodnotí LoF varianty jako přímo patogenní v rámci patofyziologie ALS (Brenner D. et al., 2016), jiní argumentují, že se jedná pouze o faktor zvýšené susceptibility a spekulují stran nutnosti jeho oligogenní interakce s jinými vzácnými variantami v genech, asociovaných s ALS, jako podmínce k rozvoji nemoci (Lattante S. et al., 2021; Riva N. et al., 2022). U našeho pacienta jsme nenalezli žádnou další variantu v relevantních genech; při zohlednění výše uvedených faktů jsme tak variantu klasifikovali jako nejasného významu.

Detekovali jsme rovněž dvě varianty v genu *TBK1* u dvou pacientů se spinálním rozvojem sALS, bez současně přítomné FTD. U první varianty se jednalo o již zaznamenanou, pravděpodobně patogenní variantu typu splice-donor c.540+1G>T (Cirruli ET. et al., 2015), která pravděpodobně narušuje sestřihové místo a mechanismem ztráty funkce pravděpodobně vede k haploinsuficienci exprimovaného enzymu, což je hlavním podkladem patogenicity (Lu YQ. et al., 2022). TANK-Binding (vázající) Kinaza 1 (TBK1) pravděpodobně hraje významnou roli v degradaci celulárních proteinů cestou autofagického aparátu (Chua JP. et al., 2022); dále se podílí na neuroinflamačních procesech (prostřednictvím dráhy NF-κB) (Ahmad L. et al., 2016). Oba tyto mechanismy hrají významnou roli v progresi neurodegenerace. Druhá varianta, detekovaná v našem souboru, byla nová, dosud nepopsaná substituce typu missense, p.(Met690Thr); na základě predikce *in silico* analýzy jsme tuto variantu klasifikovali jako nejasného významu. Mechanismy, kterými missense mutace mohou vést k patogenezi ALS, nadále nejsou uspokojivě objasněny (Gurfinkel Y. et al., 2022). Nález z našeho souboru přispívá k narůstajícímu souboru důkazů pro význam variant v *TBK1* u sporadických forem ALS.

Zajímavým nálezem byla detekce dvou variant v genu *FIG4*. Ačkoliv dosud byly homozygotní varianty v tomto genu popisovány pouze jako příčina autozomálně recesivní formy CMT nemoci 4J, řada recentních studií přinesla důkazy (na úrovni kazustických popisů) pro význam tohoto genu v patogenezi autozomálně dominantní familiární formy ALS typ 11 (Osmanovic A. et al., 2017; Müller K. et al., 2018; van Blitterswijk M. et al., 2012). Námí zachycená varianta p.(Ile41Thr) v heterozygotním stavu byla opakovaně popisována v evropských (Osmanovic A. et al., 2017) a rovněž severoamerických kohortách (Cady J. et al., 2015) a stran hodnocení její patogenicity jsou v databázi ClinVar publikovány protichůdné závěry. S ohledem na relativně vysokou populační prevalenci



této varianty, referovanou v databázi kontrol gnomAD (0.002) se domníváme, že patogenicitu této varianty není dostatečně významná, aby samostatně vedla k rozvoji ALS. Tato naše hypotéza je v souladu se závěry jiné, recentní studie (Scarlino S. et al., 2022). Další variantu v jiném genu jsme ale u dané pacientky nedetekovali. Druhá, námi zachycená varianta ve *FIG4*: p.(Arg699Cys) byla popsána v německé kohortě fALS pacientů (Müller K. et al., 2018). Ačkoliv *in silico* predikce ukazují její pravděpodobnou patogenicitu, bez možnosti segregční analýzy (která nebyla v případě pacienta z naší, ani z německé kohorty, proveditelná) nelze význam této varianty validně prokázat. Analogickým případem byl nálezn vzácné varianty p.(Pro494Leu) v genu *UBQLN2*, která byla popsána u fALS pacienty z francouzské kohorty (Teyssou E. et al., 2017); ani u této varianty nebylo v našem souboru, resp. v původní francouzské práci možné, realizovat segregční analýzu.

U dalších dvou pacientů se sALS jsme detekovali dvě nové missense varianty v genu *SETX*. Varianty v tomto genu jsou asociovány s autozomálně dominantní formou ALS typ 4, pro kterou je typický časný věk rozvoje. Tato vzácná, familiární forma ALS byla dosud popisována jako velmi pomalu progresivní, bez postižení respiračních nebo bulbárních svalů (Bennet CL. et al., 2018); některé práce ovšem argumentují stran větší variability fenotypů u forem, podmíněných mutacemi v tomto genu (Tripolszki K. et al., 2017). Pacientka, u které jsme detekovali variantu p.(Phe1599Ser) vykazovala časný rozvoj nemoci (v 38 letech) s predominantním postižením kortikospinální dráhy; v dalším průběhu nemoci rozvinula ovšem výrazné, kombinované pseudobulbární a bulbární postižení. U druhého pacienta jsme detekovali variantu p.(Ser2289Pro); tento pacient vykazoval standardní věk rozvoje onemocnění a relativně rychlou progresi (zemřel 26 měsíců od prvních projevů). Bez možnosti segregční analýzy, resp. funkčních důkazů nejsme schopni dále posoudit patogenicitu těchto dvou variant.

Zachytili jsme dvě již známé, pravděpodobně patogenní mutace typu posunu čtecího rámce (frameshift – fs) v genu *SPG11* v heterozygotním stavu: p.(Leu920Thrfs\*10) a p.(Glu1026Argfs\*4) (Elert-Dobkowska E. et al., 2019; Günther S. et al., 2016); dále poté novou, dosud nepopsanou variantu p.(Ser3Phe) v genu *SPAST*. Ačkoliv oba geny – *SPG11* i *SPAST* – jsou predominantně asociovány jako kauzální s hereditární spastickou paraplegií, homozygotní varianty v *SPG11* byly popsány u autozomálně resesivní, juvenilní formy ALS (Orlacchio A. et al., 2010), resp. varianty v *SPAST* byly na úrovni kazuistik popsány u pacientů s ALS (Meyer T. et al., 2005; Münch C. et al., 2008).

Heterozygotní varianty v *SPG11* byly zaznamenány ve větších kohortách fALS, resp. sALS pacientů (Couthouis J. et al., 2014; Kenna KP. et al., 2013), avšak tyto studie se cíleně nezabývaly určením kauzálního významu daných variant, resp. nepřinesly v tomto ohledu žádné významné důkazy. Co se týče námi detekovaných heterozygotních variant v *SPG11*, zvažovali jsme i možnost, že druhá varianta nebyla odhalena (např. hluboká intronová lokalizace varianty, nebo v případě rozsáhlejší repetice). Fenotyp pacientů, u kterých jsme tyto varianty našli (standadní věk rozvoje u obou, bulbární rozvoj u jednoho, izolované postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu u druhého) nekorespondoval s dosud popsányi případy ALS, kauzálně podmíněnými mutací v *SPG11*. Zhodnotili jsme tedy v souhrnu klinický význam těchto variant jako nejasný.

Jsme si plně vědomí limitací naší studie. První z nich je odlišný přístup v přípravě DNA knihoven mezi oběma kohortami, resp. laboratořemi, což vedlo k rozdílné míře pokrytí všech genů, relevantních pro patogenezi ALS. Celkově malý soubor pacientů mohl vést k situaci, že řada nízké-frekventních variant, které se v české populaci mohou vyskytovat, nemusela být reprezentována. S ohledem na fakt, že se nejednalo o populační studii, resp. že některé skupiny byly v našem souboru disproporčně více zastoupeny (fALS, skupina s časným rozvojem onemocnění), pozorované frekvence detekovaných variant nemusí zcela realisticky reflektovat situaci v celé české populaci ALS pacientů. Zároveň relativně malý soubor pacientů vedl k obecně nízké statistické síle všech komparačních testů, což limituje výpovědní hodnotu a zevšeobecnitelnost pozorovaných fenotypových znaků, asociovaných s větší pravděpodobností detekce kauzálních variant.



## 6. ZÁVĚR

V otázce možnosti využití neurofilament jako diagnostických, popř. prognostických biomarkerů u ALS lze naše poznatky shrnout do konstatování, že z perspektivy obecné populace pacientů s ALS, s jasně vyjádřeným klinickým nálezem (včetně absence vylučujících kritérií) a bez suspektního radiologického nálezu, dosahují elevované hladiny neurofilament v likvoru dobré diagnostické efektivity k odlišení od alternativních diagnóz a mohou být využity jako silné podpůrné kritérium definitivní diagnózy. Diagnostická síla obou neurofilament v likvoru byla v našem souboru srovnatelná. Vždy je ovšem nutné respektovat nespécifickou povahu těchto biomarkerů, tzn. fakt, že reflektují rozsah a dynamiku obecného axonálního poškození, nikoliv patofyziologické pochody, specifické pro ALS. V otázce prognostického významu hladin neurofilament jsme poté pozorovali nejsilnější míru korelace mezi délkou přežití a hladinami NfL v likvoru; hladina NfL ovšem nebyl superiorní proti stávajícímu predikčnímu nástroji, založeném na jednoduché kalkulaci dat z všeobecně dostupné a rozšířené klinimetrické škály ALS-FRS-R ( $\Delta$ FS).

Na druhou stranu, prokázali jsme, že faktory, které vedou k inkompletně vyjádřenému klinickému obrazu ALS (izolované postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu, pomalá progresse nemoci), jsou zároveň asociovány s nižšími hladinami obou neurofilament v likvoru. Pro tyto fenotypy onemocnění je poté diagnostický přínos stanovení hladin neurofilament významně nižší. Stejně tak v případech, kdy cílem je odlišit pacienty s ALS a zároveň radiologickým nálezem, suspektním z komprese, od jednotek s prostou kompresí nervových struktur, není následkem velkého překryvu hladin mezi oběma skupinami (a na straně prostých kompresí pak hlavně u pacientů s akutními stavy, kteří nejvíce profitují z chirurgické léčby) elevace hladin neurofilament spolehlivým diskriminačním nástrojem.

Nakonec, ačkoliv měření p-NfH ze séra s využitím ELISA soupravy představuje hypoteticky praktické řešení i pro ambulantní péči, nízká senzitivita, resp. specificita testu k detekci pacientů s ALS nepodporuje, dle našeho názoru, jeho využití ani jako screeningového nástroje. V době, kdy jsou k dispozici zcela superiorní metody detekce (SiMoA) neurofilament v krvi, nevyváží jeho dostupnost a nízká cena nedostatečnou diagnostickou efektivitu testu na bázi ELISA soupravy.

Na základě poznatků z další naší studie, zaměřené na detekci variant v genech, asociovaných s ALS, resp. na definování klinických prediktorů kauzálních mutací, lze konstatovat, že frekvence HRE v *C9orf72* je mezi českými pacienty s ALS velmi podobná,

jako v ostatních evropských populacích. Zároveň naše pozorování naznačuje určité konzistentní fenotypové znaky (bulbární region rozvoje, nebo fenotyp s predominantním bulbárním postižením; přítomnost FTD), které jsou i mezi sporadickými pacienty asociovány s větší pravděpodobností detekce HRE v *C9orf72*. I s ohledem na nejvyšší prevalenci této varianty je tak z našeho pohledu racionálním prvním krokem molekulárně genetického vyšetření, provést vyšetření expanze hexanukleotidových repetitiv v *C9orf72*, obzvláště u pacientů s uvedeným fenotypem.

Patogenní, resp. pravděpodobně patogenní varianty ve *FUS*, *TARDBP* a *TBKI*, které jsou nalézány u ostatních evropských kohort, jsou přítomny i v populaci českých pacientů s ALS. Na druhou stranu, v našem souboru jsme nenalezli žádnou prokazatelně kauzální variantu v *SOD1*. V rozporu s původním záměrem, na základě kterého jsme cíleně zařadili disproporčně velký počet pacientů s časným věkem rozvoje ALS, jsme u této skupiny pozorovali nízkou záchytnost patogenních, resp. pravděpodobně patogenních variant. Na druhou stranu, tento poznatek implikuje možnost existence relevantních variant v genech, které dosud nebyly definovány jako kauzálně asociované s ALS a proto nebyly ani v našem souboru vyšetřeny. Domníváme se, že další extenzivní výzkum by se měl prioritně zaměřit právě na tuto kohortu pacientů.

Ačkoliv jsme detekovali řadu variant nejasného významu, z nichž některé byly nové, dosud nepopsané, nebylo možné definitivně zhodnotit jejich patogenicitu. V tomto ohledu bude nutná nezávislá detekce v dalších kohortách, optimálně s možností segregací analýzy a vyšetření funkčního dopadu varianty (modely pro transgenní expresi, modely s indukovanými pluripotentními buňkami aj.).

## 7. SOUHRN

Amyotrofická laterální skleróza je klinicky i patofyziologicky heterogenní skupina fatálních, neurodegenerativních syndromů dospělých, dominantně postihující motorický systém; ačkoliv etiopatogeneze není stále dostatečně detailně objasněná, za poslední dekádu exponenciálně narostlo poznání její genetické etiologie. Genetické pozadí nemoci je velmi komplexní, ale jeho bližší pochopení a následně pochopení patofyziologických souvislostí nese příslib cílené, efektivnější terapie. Klinická heterogenita v důsledku přináší řadu úskalí v diagnostickém procesu a vede relativně často i k chybné diagnóze, s řadou vyplývajících nežádoucích efektů (nesprávně indikovaná chirurgická, resp. farmakologická léčba, s rizikem zhoršení průběhu onemocnění). Tato dizertační práce chce jednak upozornit na možnosti a problematiku správné a včasné diagnózy; jednak zhodnotit profil genetických variant u českých pacientů s ALS, protože tato data dosud zcela chybí. Prvním hlavním cílem práce bylo posoudit možnost implementace diagnostických testů, stanovujících hladiny lehkých (NfL) a fosforylovaných těžkých (p-NfH) řetězců neurofilament v likvoru a séru, obzvláště v klinicky diferenciatně diagnosticky obtížných situacích. Dále pak zhodnotit faktory, ovlivňující hladiny neurofilament. Druhým z hlavních cílů byla pilotní analýza a odhad frekvence genetických varianů sporadických i familiárních forem ALS, resp. u forem se současnou FTD, v ČR. Vedlejším cílem této druhé studie poté bylo určit (klinické) prediktory vyšší pravděpodobnosti záchytu kauzální mutace. Naše výsledky prokázaly, že v souboru pacientů s jasně vyjádřeným klinickým obrazem ALS dosahují hladiny neurofilament v likvoru velmi dobrou a zároveň proti sobě srovnatelnou diagnostickou efektivitu a mohou být využity jako podpůrné diagnostické kritérium. Pro diferenciatně diagnosticky složité jednotky je ale přínos těchto testů limitovaný: faktory, podmiňující nižší hladiny neurofilament, jsou významně asociovány s neúplně vyjádřeným fenotypem ALS a dále dochází u alternativních diagnóz (komprese nervových struktur) vlivem rozsáhlé axonální léze rovněž k signifikantní elevaci hladin neurofilament. Studie, hodnotící zastoupení genetických variant u českých pacientů prokázala nejvyšší frekvenci HRE v *C9orf72*, obdobně jako v ostatních evropských kohortách. Zároveň jsme prokázali, že bulbární region rozvoje, resp. současná přítomnost FTD jsou i u sporadických pacientů asociovány s větší pravděpodobností detekce této varianty. Ačkoliv jsme dále detekovali řadu variant nejasného významu, z nichž některé nebyly dosud popsány, k posouzení jejich patogenicity bude nutná nezávislá detekce v dalších kohortách, optimálně s možností segregační analýzy, popř. s provedením cílených vyšetření k určení jejich funkčního dopadu.

## 8. SUMMARY

Amyotrophic lateral sclerosis is a clinically and pathophysiologically heterogeneous group of fatal, neurodegenerative syndromes of adults, predominantly affecting the motor system; while the etiopathogenesis is still not well understood, the understanding of its genetic aetiology has increased exponentially over the last decade. The genetic background of the disease is very complex, but a closer understanding of it and its pathophysiology holds the promise of targeted, more effective therapies. Clinical heterogeneity brings several difficulties in the diagnostic process and often leads to misdiagnosis, with some consequent adverse effects (incorrectly indicated surgical or pharmacological treatment, with the risk of worsening the course of the disease). This thesis seeks to highlight the possibilities and problems of correct and early diagnosis; on the other hand, to evaluate the profile of genetic variants in Czech ALS patients, as these data are still lacking. The first main aim of the thesis was to assess the possibility of implementing diagnostic tests, based on the assessment of the levels of light (NfL) and phosphorylated heavy (p-NfH) neurofilament chains in cerebrospinal fluid and serum, especially in clinically difficult-to-distinguish situations. In addition, we aimed to evaluate the factors influencing neurofilament levels. The second main objective was a pilot study, estimating the frequency of genetic variants in sporadic and familial forms of ALS, or forms with concurrent FTD, in the Czech Republic. A secondary aim of this study was to identify (clinical) predictors of a higher probability of detecting the causal mutation. Our results showed that in a cohort of patients with a clear clinical picture of ALS, neurofilament levels in the CSF achieve very good and comparable to each other diagnostic performance and can be used as a supportive diagnostic criterion. However, for difficult-to-distinguish entities, the utility of these tests is limited: factors underlying lower neurofilament levels are significantly associated with an incompletely expressed ALS phenotype, and alternative diagnoses (nerve root or myelon compression) due to extensive axonal lesions also result in significant elevation of neurofilament levels. A study evaluating the representation of genetic variants in Czech patients showed the highest frequency of HRE in C9orf72, similar to other European cohorts. We also demonstrated that the bulbar region of development or the simultaneous presence of FTD is associated with a higher probability of detecting this variant among sporadic patients. Furthermore, although we detected several variants of unclear significance, some of which were novel, independent detection in other cohorts will be required to assess their pathogenicity, optimally including segregation analysis or targeted testing to determine their functional impact.

## 9. LITERATURA

1. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012 Nov 1;491(7422):56-65. doi: 10.1038/nature11632
2. Abrahams S, Newton J, Niven E, Foley J & Bak TH (2014). Screening for cognition and behaviour changes in ALS. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*, 15(1-2), 9–14. <https://doi.org/10.3109/21678421.2013.805784>
3. Aggarwal A, Nicholson G. Normal complement of motor units in asymptomatic familial (SOD1 mutation) amyotrophic lateral sclerosis carriers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001 Oct;71(4):478-81. doi: 10.1136/jnnp.71.4.478.
4. Aggarwal A, Nicholson G. Detection of preclinical motor neurone loss in SOD1 mutation carriers using motor unit number estimation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002 Aug;73(2):199-201. doi: 10.1136/jnnp.73.2.199.
5. Agosta F, Altomare D, Festari C, Orini S, Gandolfo F, Boccardi M et al. (2018). Clinical utility of FDG-PET in amyotrophic lateral sclerosis and Huntington's disease. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 45(9), 1546–1556. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4033-0>
6. Ahmad L, Zhang SY, Casanova JL, Sancho-Shimizu V. Human TBK1: A Gatekeeper of Neuroinflammation. *Trends Mol Med*. 2016 Jun;22(6):511-527. doi: 10.1016/j.molmed.2016.04.006.
7. Al-Chalabi A, Fang F, Hanby MF, Leigh PN, Shaw CE, Ye W, et al. (2010). An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 81(12), 1324–1326. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.207464>
8. Al-Chalabi A, Lewis CM. Modelling the effects of penetrance and family size on rates of sporadic and familial disease. *Hum Hered*. 2011;71(4):281-8. doi: 10.1159/000330167.
9. Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol*. 2013 Nov;9(11):617-28. doi: 10.1038/nrneurol.2013.203.
10. Al-Chalabi A, Calvo A, Chio A, Colville S, Ellis CM, Hardiman O, et al (2014). Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: a population-based

- modelling study. *The Lancet. Neurology*, 13(11), 1108–1113.  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70219-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70219-4)
11. Al-Chalabi A, van den Berg LH, Veldink J. Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical management. *Nat Rev Neurol*. 2017 Feb;13(2):96-104. doi: 10.1038/nrneurol.2016.182
  12. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Dec 22;351(3):602-11. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.093.
  13. Aulas A, Vande Velde C. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS? *Front Cell Neurosci*. 2015 Oct 23;9:423. doi: 10.3389/fncel.2015.00423.
  14. Bailey JM, Colón-Rodríguez A, Atchison WD. Evaluating a Gene-Environment Interaction in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Methylmercury Exposure and Mutated SOD1. *Curr Environ Health Rep*. 2017 Jun;4(2):200-207. doi:10.1007/s40572-017-0144-1.
  15. Baradaran-Heravi Y, Van Broeckhoven Ch, van der Zee J, Stress granule mediated protein aggregation and underlying gene defects in the FTD-ALS spectrum, *Neurobiology of Disease*, Volume 134, 2020, 104639, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104639>.
  16. Bede P, Omer T, Finegan E, Chipika RH, Iyer PM, Doherty MA, et al. Connectivity-based characterisation of subcortical grey matter pathology in frontotemporal dementia and ALS: a multimodal neuroimaging study. *Brain Imaging Behav*. 2018 Dec;12(6):1696-1707. doi: 10.1007/s11682-018-9837-9.
  17. Benatar M, Wu J, Andersen PM, Lombardi V & Malaspina A (2018). Neurofilament light: A candidate biomarker of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis and phenoconversion. *Annals of neurology*, 84(1), 130–139.  
<https://doi.org/10.1002/ana.25276>
  18. Bendotti C, Marino M, Cheroni C, Fontana E, Crippa V, Poletti A et al. (2012). Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: implication for protein aggregation and immune response. *Progress in neurobiology*, 97(2), 101–126. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.10.001>
  19. Bendotti C, Bonetto V, Pupillo E, Logroscino G, Al-Chalabi A, Lunetta C, et al (2020). Focus on the heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral*

- sclerosis & frontotemporal degeneration, 21(7-8), 485–495.  
<https://doi.org/10.1080/21678421.2020.177929>
20. Bennett CL, Dastidar SG, Ling SC, Malik B, Ashe T, Wadhwa M, et al. Senataxin mutations elicit motor neuron degeneration phenotypes and yield TDP-43 mislocalization in ALS4 mice and human patients. *Acta Neuropathol.* 2018 Sep;136(3):425-443. doi: 10.1007/s00401-018-1852-9
  21. Belzil VV, Katzman RB, Petrucelli L. ALS and FTD: an epigenetic perspective. *Acta Neuropathol.* 2016 Oct;132(4):487-502. doi: 10.1007/s00401-016-1587-4.
  22. Berlowitz DJ, Howard ME, Fiore JF Jr, Vander Hoorn S, O'Donoghue FJ, et al. (2016). Identifying who will benefit from non-invasive ventilation in amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease in a clinical cohort. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 87(3), 280–286. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-310055>
  23. Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 69(3), 89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
  24. Blecher R, Elliott MA, Yilmaz E, Dettori JR, Oskouian RJ, Patel A, et al. Contact Sports as a Risk Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review. *Global Spine J.* 2019 Feb;9(1):104-118. doi: 10.1177/2192568218813916.
  25. Braak H, Brettschneider J, Ludolph AC, Lee VM, Trojanowski JQ, Del Tredici K. Amyotrophic lateral sclerosis--a model of corticofugal axonal spread. *Nat Rev Neurol.* 2013 Dec;9(12):708-14. doi: 10.1038/nrneurol.2013.221.
  26. Bradley WG & Mash DC (2009). Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 10 Suppl 2, 7–20.  
<https://doi.org/10.3109/17482960903286009>
  27. Brenner D, Müller K, Wieland T, Weydt P, Böhm S, Lulé D, et al. NEK1 mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis, *Brain*, Volume 139, Issue 5, May 2016, Page e28, <https://doi.org/10.1093/brain/aww033>
  28. Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, Robinson JL, Irwin DJ, Grossman M, et al. Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2013 Jul;74(1):20-38. doi: 10.1002/ana.23937.

29. Bridel C, van Wieringen WN, Zetterberg, H, Tijms BM, Teunissen CN, and the NFL Group et al. (2019). Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein in Neurology: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA neurology*, 76(9), 1035–1048. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.1534>
30. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL; World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000 Dec;1(5):293-9. doi: 10.1080/146608200300079536.
31. Brooks DJ (2021). Future Imaging in Dementia. *Seminars in nuclear medicine*, 51(3), 303–308. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2020.12.001>
32. Brusati A, Peverelli S, Calzari L, Tiloca C, Casiraghi V, Sorce MN, et al. Exploring epigenetic drift and rare epivariations in amyotrophic lateral sclerosis by epigenome-wide association study. *Front Aging Neurosci*. 2023 Nov 27;15:1272135. doi: 10.3389/fnagi.2023.1272135.
33. Burrell JR, Kiernan MC, Vucic S & Hodges JR (2011). Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology*, 134(Pt 9), 2582–2594. <https://doi.org/10.1093/brain/awr195>
34. Cady J, Allred P, Bali T, Pestronk A, Goate A, Miller TM et al. Amyotrophic lateral sclerosis onset is influenced by the burden of rare variants in known amyotrophic lateral sclerosis genes. *Ann Neurol*. 2015 Jan;77(1):100-13. doi: 10.1002/ana.24306.
35. Cannas A, Borghero G, Floris GL, Solla P, Chiò A, Traynor BJ, et al. The p.A382T TARDBP gene mutation in Sardinian patients affected by Parkinson's disease and other degenerative parkinsonisms. *Neurogenetics*. 2013 May;14(2):161-6. doi: 10.1007/s10048-013-0360-2.
36. Canosa A, Moglia C, Manera U, Vasta R, Torrieri MC, Arena V et al. (2020). Metabolic brain changes across different levels of cognitive impairment in ALS: a 18F-FDG-PET study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, jnnp-2020-323876. Advance online publication. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-323876>
37. Carvalho M., Schwartz M.S., Swash M. Involvement of the external anal sphincter in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 1995;18:848–853. doi: 10.1002/mus.880180808.
38. Cellura, E., Spataro, R., Taiello, A. C., & La Bella, V. (2012). Factors affecting the diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery*, 114(6), 550–554. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2011.11.026>



39. Cicero CE, Mostile G, Vasta R, Rapisarda V, Signorelli SS, Ferrante M, et al. Metals and neurodegenerative diseases. A systematic review. *Environ Res.* 2017 Nov;159:82-94. doi: 10.1016/j.envres.2017.07.048.
40. Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS, et al. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science.* 2015 Mar 27;347(6229):1436-41. doi: 10.1126/science.aaa3650.
41. Cooper-Knock J, Kirby J, Highley R, Shaw PJ. The Spectrum of C9orf72-mediated Neurodegeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2015 Apr;12(2):326-39. doi: 10.1007/s13311-015-0342-1.
42. Cooper-Knock J, Robins H, Niedermoser I, Wyles M, Heath PR, Higginbottom A, et al. Targeted Genetic Screen in Amyotrophic Lateral Sclerosis Reveals Novel Genetic Variants with Synergistic Effect on Clinical Phenotype. *Front Mol Neurosci.* 2017 Nov 9;10:370. doi: 10.3389/fnmol.2017.00370
43. Cooper-Knock J, Harvey C, Zhang S, Moll T, Timpanaro IS, Kenna KP, et al. Advances in the genetic classification of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2021 Oct 1;34(5):756-764. doi: 10.1097/WCO.0000000000000986.
44. Cordts I, Wachinger A, Scialo C, Lingor P, Polymenidou M, Buratti E et al. (2023). TDP-43 Proteinopathy Specific Biomarker Development. *Cells*, 12(4), 597. <https://doi.org/10.3390/cells12040597>
45. Costa LG, Vitalone A, Cole TB and Furlong CE (2005). Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical pharmacology*, 69(4), 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.08.027>
46. Couthouis J, Raphael AR, Daneshjou R, Gitler AD. Targeted exon capture and sequencing in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet.* 2014 Oct 9;10(10):e1004704. doi: 10.1371/journal.pgen.1004704.
47. Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D. The "dying-back" phenomenon of motor neurons in ALS. *J Mol Neurosci.* 2011 Mar;43(3):470-7. doi:10.1007/s12031-010-9467-1.
48. de Almeida, FEO, do Carmo Santana AK, & de Carvalho FO. (2021). Multidisciplinary care in Amyotrophic Lateral Sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 42(3), 911–923. <https://doi.org/10.1007/s10072-020-05011-2>

49. de Boer EMJ, Orié VK, Williams T, Baker MR, De Oliveira HM, Polvikoski T, et al. TDP-43 proteinopathies: a new wave of neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020 Nov 11;92(1):86–95. doi: 10.1136/jnnp-2020-322983.
50. de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol*. 2008 Mar;119(3):497-503. doi: 10.1016/j.clinph.2007.09.143.
51. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):245-56. Doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011.
52. Del Tredici K, Braak H. Neuropathology and neuroanatomy of TDP-43 amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2022 Oct 1;35(5):660-671. doi: 10.1097/WCO.0000000000001098.
53. De Schaepdryver M, Jeromin A, Gille B, Claeys KG, Herbst V, Brix B et al. Comparison of elevated phosphorylated neurofilament heavy chains in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Apr;89(4):367-373. doi: 10.1136/jnnp-2017-316605
54. de Souza PVS, Pinto WBVR, Farias IB, Badia BML, Pinto IFN, Costa GC et al. (2021). Progressive spastic tetraplegia and axial hypotonia (STAHP) due to SOD1 deficiency: is it really a new entity?. *Orphanet journal of rare diseases*, 16(1), 360. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01993-0>
55. Ding X, Xiang Z, Qin C, Chen Y, Tian H, Meng L, et al. Spreading of TDP-43 pathology via pyramidal tract induces ALS-like phenotypes in TDP-43 transgenic mice. *Acta Neuropathol Commun*. 2021 Jan 18;9(1):15. doi: 10.1186/s40478-020-01112-3.
56. Dreger, M., Steinbach, R., Gaur, N., Metzner, K., Stubendorff, B., Witte, O. W et al. (2021). Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Chain (NfL) Predicts Disease Aggressiveness in Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Application of the D50 Disease Progression Model. *Frontiers in neuroscience*, 15, 651651. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.651651>
57. Dreger M, Steinbach R, Otto M, Turner MR, Grosskreutz J. Cerebrospinal fluid biomarkers of disease activity and progression in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022 Apr;93(4):422-435. doi: 10.1136/jnnp-2021-327503.

58. Dorst, J., Schuster, J., Dreyhaupt, J., Witzel, S., Weishaupt, J. H. et al. (2020). Effect of high-caloric nutrition on serum neurofilament light chain levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 91(9), 1007–1009. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-323372>
59. Ebersbach T, Roediger A, Steinbach R, Appelfeller M, Tuemmler A, Stubendorff B et al. (2022). Motor unit number index (MUNIX) in the D50 disease progression model reflects disease accumulation independently of disease aggressiveness in ALS. *Scientific reports*, 12(1), 15997. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19911-0>
60. Ederle H, Dormann D. TDP-43 and FUS en route from the nucleus to the cytoplasm. *FEBS Lett*. 2017 Jun;591(11):1489-1507. doi: 10.1002/1873-3468.12646.
61. EFNS Task Force on Diagnosis and Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis:, Andersen PM, Abrahams S, Borasio GD, de Carvalho M, Chio A, Van Damme P. et al. (2012). EFNS guidelines on the clinical management of amyotrophic lateral sclerosis (MALS)--revised report of an EFNS task force. *European journal of neurology*, 19(3), 360–375. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2011.03501.x>
62. Eisen A, Braak H, Del Tredici K, Lemon R, Ludolph AC, Kiernan MC. Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017 Nov;88(11):917-924. doi: 10.1136/jnnp-2017-315573.
63. Eisen A. The Dying Forward Hypothesis of ALS: Tracing Its History. *Brain Sci*. 2021 Feb 27;11(3):300. doi: 10.3390/brainsci11030300.
64. Elamin M, Bede P, Byrne S, Jordan N, Gallagher L, Wynne B, et al. (2013). Cognitive changes predict functional decline in ALS: a population-based longitudinal study. *Neurology*, 80(17), 1590–1597. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828f18ac>
65. Elamin M, Bede P, Montuschi A, Pender N, Chio A, & Hardiman O (2015). Predicting prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: a simple algorithm. *Journal of neurology*, 262(6), 1447–1454. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7731-6>
66. Elden AC, Kim HJ, Hart MP, Chen-Plotkin AS, Johnson BS, Fang X, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*. 2010 Aug 26;466(7310):1069-75. doi: 10.1038/nature09320.
67. Elert-Dobkowska E, Stepniak I, Krysa W, Ziora-Jakutowicz K, Rakowicz M, Sobanska A et al. Next-generation sequencing study reveals the broader variant spectrum of hereditary spastic paraplegia and related phenotypes. *Neurogenetics*. 2019 Mar;20(1):27-38. doi: 10.1007/s10048-019-00565-6

68. Fallini C, Bassell GJ, Rossoll W. The ALS disease protein TDP-43 is actively transported in motor neuron axons and regulates axon outgrowth. *Hum Mol Genet.* 2012 Aug 15;21(16):3703-18. doi: 10.1093/hmg/dds205.
69. Fang YS, Tsai KJ, Chang YJ, Kao P, Woods R, Kuo PH et al. Full-length TDP-43 forms toxic amyloid oligomers that are present in frontotemporal lobar dementia-TDP patients. *Nat Commun.* 2014 Sep 12;5:4824. doi: 10.1038/ncomms5824.
70. Fatima M, Tan R, Halliday GM, Kril JJ. Spread of pathology in amyotrophic lateral sclerosis: assessment of phosphorylated TDP-43 along axonal pathways. *Acta Neuropathol Commun.* 2015 Jul 28;3:47. doi: 10.1186/s40478-015-0226-y.
71. Feneberg E, Steinacker P, Lehnert S, Schneider A, Walther P, Thal DR et al. (2014). Limited role of free TDP-43 as a diagnostic tool in neurodegenerative diseases. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*, 15(5-6), 351–356. <https://doi.org/10.3109/21678421.2014.905606>
72. Feneberg, E., Gray, E., Ansorge, O., Talbot, K., Turner, M. R. (2018). Towards a TDP-43-Based Biomarker for ALS and FTLN. *Molecular neurobiology*, 55(10), 7789–7801. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0947-6>
73. Fontana A, Marin B, Luna J, Beghi E, Logroscino G, Boumédiène F, et al. Time-trend evolution and determinants of sex ratio in Amyotrophic Lateral Sclerosis: a dose-response meta-analysis. *J Neurol.* 2021 Aug;268(8):2973-2984. doi: 10.1007/s00415-021-10464-2.
74. Galvin M, Ryan P, Maguire S, Heverin M, Madden C, Vajda A, et al. The path to specialist multidisciplinary care in amyotrophic lateral sclerosis: A population-based study of consultations, interventions and costs. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179796.
75. Gaiani A, Martinelli I, Bello L et al. Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Neurofilament Light Chain Levels in Definite Subtypes of Disease. *JAMA Neurol.* 2017 May 1;74(5):525-532. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.5398
76. Garton FC, Trabjerg BB, Wray NR, Agerbo E. Cardiovascular disease, psychiatric diagnosis and sex differences in the multistep hypothesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.* 2021 Feb;28(2):421-429. doi: 10.1111/ene.14554.
77. Gendron TF, Bieniek KF, Zhang YJ, Jansen-West K, Ash PE, Caulfield T, et al. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathol.* 2013 Dec;126(6):829-44. doi: 10.1007/s00401-013-1192-8.

78. Gentile G, Perrone B, Morello G, Simone IL, Andò S, Cavallaro S, Conforti FL. Individual Oligogenic Background in p.D91A-SOD1 Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Genes (Basel)*. 2021 Nov 23;12(12):1843. doi: 10.3390/genes12121843
79. Geser F, Martinez-Lage M, Robinson J, Uryu K, Neumann M, Brandmeir NJ, et al. Clinical and pathological continuum of multisystem TDP-43 proteinopathies. *Arch Neurol*. 2009 Feb;66(2):180-9. doi: 10.1001/archneurol.2008.558.
80. Giannoccaro MP, Bartoletti-Stella A, Piras S, Casalena A, Oppi F, Ambrosetto G, et al. The First Historically Reported Italian Family with FTD/ALS Teaches a Lesson on C9orf72 RE: Clinical Heterogeneity and Oligogenic Inheritance. *J Alzheimers Dis*. 2018;62(2):687-697. doi: 10.3233/JAD-170913.
81. Gordon PH, Cheng B, Katz IB, Pinto M, Hays AP, Mitsumoto H et al. The natural history of primary lateral sclerosis. *Neurology*. 2006 Mar 14;66(5):647-53. doi: 10.1212/01.wnl.0000200962.94777.71.
82. Goutman SA, Boss J, Jang DG, Mukherjee B, Richardson RJ, Batterman S, et al. Environmental risk scores of persistent organic pollutants associate with higher ALS risk and shorter survival in a new Michigan case/control cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2024 Feb 14;95(3):241-248. doi: 10.1136/jnnp-2023-332121.
83. Gromicho M, Figueiral M, Uysal H, Grosskreutz J, Kuzma-Kozakiewicz M, Pinto S, et al. Spreading in ALS: The relative impact of upper and lower motor neuron involvement. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020 Jul;7(7):1181-1192. doi: 10.1002/acn3.51098.
84. Günther S, Elert-Dobkowska E, Soehn AS, Hinreiner S, Yoon G, Heller R, Hellenbroich Y, Hübner CA, Ray PN, Hehr U, Bauer P, Sulek A, Beetz C. High Frequency of Pathogenic Rearrangements in SPG11 and Extensive Contribution of Mutational Hotspots and Founder Alleles. *Hum Mutat*. 2016 Jul;37(7):703-9. doi: 10.1002/humu.23000.
85. Gurfinkel Y, Polain N, Sonar K, Nice P, Mancera RL, Rea SL. Functional and structural consequences of TBK1 missense variants in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2022 Nov;174:105859. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105859.
86. Halbgebauer S, Steinacker P, Verde F, Weishaupt J, Oeckl P, von Arnim C et al. (2022). Comparison of CSF and serum neurofilament light and heavy chain as differential diagnostic biomarkers for ALS. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 93(1), 68–74. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2021-327129>

87. Hannaford A, Pavey N, van den Bos M, Geevasinga N, Menon P, Shefner JM, et al. Diagnostic Utility of Gold Coast Criteria in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol*. 2021 May;89(5):979-986. doi: 10.1002/ana.26045.
88. Harrison AF, Shorter J. RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease. *Biochem J*. 2017 Apr 7;474(8):1417-1438. doi: 10.1042/BCJ20160499.
89. Heffernan C, Jenkinson C, Holmes T, Feder G, Kupfer R, Leigh PN, et al. (2004). Nutritional management in MND/ALS patients: an evidence based review. *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders : official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, 5(2), 72–83. <https://doi.org/10.1080/14660820410020349>
90. Henderson RD, Kepp KP, Eisen A. ALS/FTD: Evolution, Aging, and Cellular Metabolic Exhaustion. *Front Neurol*. 2022 May 27;13:890203. doi: 10.3389/fneur.2022.890203.
91. Hogden A, Foley G, Henderson RD, James N, & Aoun SM. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis: improving care with a multidisciplinary approach. *Journal of multidisciplinary healthcare*, 10, 205–215. <https://doi.org/10.2147/JMDH.S134992>
92. Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2019 Oct;15(10):565-581. doi: 10.1038/s41582-019-0244-7.
93. Huang F, Zhu Y, Hsiao-Nakamoto J, Tang X, Dugas JC, Moscovitch-Lopatin M et al. Longitudinal biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020 Jul;7(7):1103-1116. doi: 10.1002/acn3.51078.
94. Chapman L, Cooper-Knock J, Shaw PJ. Physical activity as an exogenous risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Brain*. 2023 May 2;146(5):1745-1757. doi: 10.1093/brain/awac470.
95. Chelstowska B, Barańczyk-Kuźma A, Kuźma-Kozakiewicz M. Dyslipidemia in patients with amyotrophic lateral sclerosis - a case control retrospective study. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2021 May;22(3-4):195-205. doi: 10.1080/21678421.2020.1832119.
96. Chia R, Chiò A, Traynor BJ. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol*. 2018 Jan;17(1):94-102. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30401-5.

97. Chio A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 2005;128:472–6. <https://doi.org/10.1093/brain/awh373>.
98. Chio A, Bottacchi E, Buffa C, Mutani R, Mora G. Positive effects of tertiary centres for amyotrophic lateral sclerosis on outcome and use of hospital facilities. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 948–950
99. Chio A, Calvo A, Ilardi A, Cavallo E, Moglia C, Mutani R, et al. Lower serum lipid levels are related to respiratory impairment in patients with ALS. *Neurology*. 2009 Nov 17;73(20):1681-5. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c1df1e.
100. Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E, Traynor BG; Eurals Consortium. Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009 Oct-Dec;10(5-6):310-23. doi: 10.3109/17482960802566824. PMID: 19922118; PMCID: PMC3515205.
101. Chiò A, Calvo A, Moglia C, Mazzini L, Mora G; PARALS study group. Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 Jul;82(7):740-6. doi: 10.1136/jnnp.2010.235952. Epub 2011 Mar 14. PMID: 21402743.
102. Chiò A, Borghero G, Pugliatti M, Ticca A, Calvo A, Moglia C et al. Large proportion of amyotrophic lateral sclerosis cases in Sardinia due to a single founder mutation of the TARDBP gene. *Arch Neurol*. 2011 May;68(5):594-8. doi: 10.1001/archneurol.2010.352
103. Chiò A, Borghero G, Restagno G, Mora G, Drepper C, Traynor BJ et al. Clinical characteristics of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the pathogenic GGGGCC hexanucleotide repeat expansion of C9ORF72. *Brain*. 2012 Mar;135(Pt 3):784-93. doi: 10.1093/brain/awr366
104. Chiò A, Mazzini L, D'Alfonso S, Corrado L, Canosa A, Moglia C, et al. The multistep hypothesis of ALS revisited: The role of genetic mutations. *Neurology*. 2018 Aug 14;91(7):e635-e642. doi: 10.1212/WNL.0000000000005996.
105. Chio A, Moglia C, Canosa A, Manera U, D'Ovidio F, Vasta R, et al. ALS phenotype is influenced by age, sex, and genetics: A population-based study. *Neurology*. 2020 Feb 25;94(8):e802-e810. doi: 10.1212/WNL.0000000000008869.
106. Chua JP, De Calbiac H, Kabashi E, Barmada SJ. Autophagy and ALS: mechanistic insights and therapeutic implications. *Autophagy*. 2022 Feb;18(2):254-282. doi: 10.1080/15548627.2021.1926656



107. Illán-Gala I, Montal V, Pegueroles J, Vilaplana E, Alcolea D, Dols-Icardo O et al. (2020). Cortical microstructure in the amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia continuum. *Neurology*, 95(18), e2565–e2576.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010727>
108. Izenberg A. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Diseases. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2023 Oct 1;29(5):1538-1563. doi: 10.1212/CON.0000000000001345.
109. Jagaraj CJ, Shadfar S, Kashani SA, Saravanabavan S, Farzana F, Atkin JD. Molecular hallmarks of ageing in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Mol Life Sci*. 2024 Mar 2;81(1):111. doi: 10.1007/s00018-024-05164-9.
110. Jeon GS, Shim YM, Lee DY, Kim JS, Kang MJ, Ahn SH, et al. Pathological Modification of TDP-43 in Amyotrophic Lateral Sclerosis with SOD1 Mutations. *Mol Neurobiol*. 2019 Mar;56(3):2007-2021. doi: 10.1007/s12035-018-1218-2.
111. Johnston CA, Stanton BR, Turner MR, Gray R, Blunt AH, Butt D, et al. Amyotrophic lateral sclerosis in an urban setting: a population based study of inner city London. *J Neurol*. 2006 Dec;253(12):1642-3. doi: 10.1007/s00415-006-0195-y.
112. Julian TH, Glasgow N, Barry ADF, Moll T, Harvey C, Klimentidis YC, et al. Physical exercise is a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: Convergent evidence from Mendelian randomisation, transcriptomics and risk genotypes. *EBioMedicine*. 2021 Jun;68:103397. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103397.
113. Kamalian A, Foroughmand I, Koski L, Darvish M, Saghadzadeh A, Kamalian A, et al. Metal concentrations in cerebrospinal fluid, blood, serum, plasma, hair, and nails in amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *J Trace Elem Med Biol*. 2023 Jul;78:127165. doi: 10.1016/j.jtemb.2023.127165.
114. Kang H, Cha ES, Choi GJ, Lee WJ. Amyotrophic lateral sclerosis and agricultural environments: a systematic review. *J Korean Med Sci*. 2014 Dec;29(12):1610-7. doi: 10.3346/jkms.2014.29.12.1610.
115. Kanouchi T, Ohkubo T, Yokota T. Can regional spreading of amyotrophic lateral sclerosis motor symptoms be explained by prion-like propagation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 Jul;83(7):739-45. doi: 10.1136/jnnp-2011-301826.
116. Kenna KP, McLaughlin RL, Byrne S, Elamin M, Heverin M, Kenny EM, et al. Delineating the genetic heterogeneity of ALS using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet*. 2013 Nov;50(11):776-83. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-101795.



117. Keogh MJ, Wei W, Aryaman J, Wilson I, Talbot K, Turner MR et al. Oligogenic genetic variation of neurodegenerative disease genes in 980 postmortem human brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Aug;89(8):813-816. doi: 10.1136/jnnp-2017-317234.
118. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2011 Mar 12;377(9769):942-55. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61156-7.
119. Kikuchi H, Almer G, Yamashita S, Guégan C, Nagai M, Xu Z et al. (2006). Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(15), 6025–6030. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509227103>
120. Kimura F, Fujimura C, Ishida S, Nakajima H, Furutama D, Uehara H, et al. (2006). Progression rate of ALSFRS-R at time of diagnosis predicts survival time in ALS. *Neurology*, 66(2), 265–267. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000194316.91908.8a>
121. Kuhle J, Barro C, Andreasson U, Derfuss T, Lindberg R, Sandelius Å, et al. Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin Chem Lab Med*. 2016 Oct 1;54(10):1655-61. doi: 10.1515/cclm-2015-1195.
122. Kušnierová P, Zeman D, Hradílek P, Čábal M, Zapletalová O. Neurofilament levels in patients with neurological diseases: A comparison of neurofilament light and heavy chain levels. *J Clin Lab Anal*. 2019 Sep;33(7):e22948. doi: 10.1002/jcla.22948
123. Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2009 Feb 27;323(5918):1205-8. doi: 10.1126/science.1166066.
124. Laferriere F, Polymenidou M. (2015). Advances and challenges in understanding the multifaceted pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Swiss medical weekly*, 145, w14054. <https://doi.org/10.4414/smw.2015.14054>
125. Lanson NA Jr, Maltare A, King H, Smith R, Kim JH, Taylor JP et al. *Drosophila* model of FUS-related neurodegeneration reveals genetic interaction between FUS and TDP-43. *Hum Mol Genet*. 2011 Jul 1;20(13):2510-23. doi: 10.1093/hmg/ddr150

126. Lattante S, Rouleau GA, Kabashi E. TARDBP and FUS mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis: summary and update. *Hum Mutat.* 2013 Jun;34(6):812-26. doi: 10.1002/humu.22319.
127. Lattante S, Doronzio PN, Conte A, Marangi G, Martello F, Bisogni G et al. Novel variants and cellular studies on patients' primary fibroblasts support a role for NEK1 missense variants in ALS pathogenesis. *Hum Mol Genet.* 2021 Mar 25;30(1):65-71. doi: 10.1093/hmg/ddab015.
128. Leblond CS, Gan-Or Z, Spiegelman D, Laurent SB, Szuto A, Hodgkinson A et al. Replication study of MATR3 in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2016 Jan;37:209.e17-209.e21. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.09.013
129. Lee SH, Kim KT, Suk KS, Lee JH, Shin JH, So DH, Kwack YH. Asymptomatic cervical cord compression in lumbar spinal stenosis patients: a whole spine magnetic resonance imaging study. *Spine (Phila Pa 1976).* 2010 Nov 1;35(23):2057-63. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181f4588a
130. Lehman EJ, HeinMJ, Baron SL, Gersic CM. Neurodegenerative causes of death among retired National Football League players. *Neurology* 2012;79:1970–4. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31826daf50>.
131. Lo Giudice T, Lombardi F, Santorelli FM, Kawarai T, Orlacchio A. Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp Neurol.* 2014 Nov;261:518-39. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.06.011.
132. Lu CH, Petzold A, Topping J, Allen K, Macdonald-Wallis C, Clarke J, et al. (2015). Plasma neurofilament heavy chain levels and disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: insights from a longitudinal study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 86(5), 565–573. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-307672>
133. Lu YQ, Chen JM, Lin H, Feng SY, Che CH, Liu CY et al. Novel Intronic Mutations of TBK1 Promote Aberrant Splicing Modes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci.* 2022 Feb 24;15:691534. doi: 10.3389/fnmol.2022.691534.
134. Ludolph A, Drory V, Hardiman O, Nakano I, Ravits J, Robberecht W, Shefner J; WFN Research Group On ALS/MND. A revision of the El Escorial criteria - 2015. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2015;16(5-6):291-2. doi: 10.3109/21678421.2015.1049183.

135. Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol*. 2007 May;61(5):427-34. doi: 10.1002/ana.21147.
136. Mandrioli J, Mediani L, Alberti S, Carra S. ALS and FTD: Where RNA metabolism meets protein quality control. *Semin Cell Dev Biol*. 2020 Mar;99:183-192. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.06.003.
137. Mann JR, Gleixner AM, Mauna JC, Gomes E, DeChellis-Marks MR, Needham PG et al. RNA Binding Antagonizes Neurotoxic Phase Transitions of TDP-43. *Neuron*. 2019 Apr 17;102(2):321-338.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2019.01.048.
138. Mann JR, McKenna ED, Mawrie D, Papakis V, Alessandrini F, Anderson EN et al. Loss of function of the ALS-associated NEK1 kinase disrupts microtubule homeostasis and nuclear import. *Sci Adv*. 2023 Aug 18;9(33):eadi5548. doi: 10.1126/sciadv.adi5548
139. Maranzano A, Verde F, Colombo E, Poletti B, Doretto A, Bonetti R, Gagliardi D, Meneri M, Maderna L, Messina S, Corti S, Morelli C, Silani V, Ticozzi N. Regional spreading pattern is associated with clinical phenotype in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2023 Oct 3;146(10):4105-4116. doi: 10.1093/brain/awad129.
140. Marin B, Logroscino G, Boumédiène F, Labrunie A, Couratier P, Babron MC et al. Clinical and demographic factors and outcome of amyotrophic lateral sclerosis in relation to population ancestral origin. *Eur J Epidemiol*. 2016 Mar;31(3):229-45. doi: 10.1007/s10654-015-0090-x. Epub 2015 Oct 12. PMID: 26458931.
141. Marin B, Boumédiène F, Logroscino G, Couratier P, Babron MC, Leutenegger AL, et al. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2017 Feb 1;46(1):57-74. doi: 10.1093/ije/dyw061.
142. McCann EP, Henden L, Fifita JA, Zhang KY, Grima N, Bauer DC et al. Evidence for polygenic and oligogenic basis of Australian sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Med Genet*. 2020 May 14;jmedgenet-2020-106866. doi: 10.1136/jmedgenet-2020-106866.
143. McCluskey L, Vandriel S, Elman L, Van Deerlin VM, Powers J, Boller A, Wood EM, Woo J, McMillan CT, Rascovsky K, Grossman M. ALS-Plus syndrome: non-pyramidal features in a large ALS cohort. *J Neurol Sci*. 2014 Oct 15;345(1-2):118-24. doi: 10.1016/j.jns.2014.07.022.

144. Menke RA, Gray E, Lu CH, Kuhle J, Talbot K, Malaspina A, Turner MR. CSF neurofilament light chain reflects corticospinal tract degeneration in ALS. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015 Jul;2(7):748-55. doi: 10.1002/acn3.212
145. Menon P, Geevasinga N, Yiannikas C, Howells J, Kiernan MC, Vucic S. (2015). Sensitivity and specificity of threshold tracking transcranial magnetic stimulation for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *The Lancet Neurology*, 14(5), 478–484. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00014-9)
146. Menon P, Higashihara M, van den Bos M, Geevasinga N, Kiernan MC, Vucic S. (2020). Cortical hyperexcitability evolves with disease progression in ALS. *Annals of clinical and translational neurology*, 7(5), 733–741. <https://doi.org/10.1002/acn3.51039>
147. Meyer T, Schwan A, Dullinger JS, Brocke J, Hoffmann KT, Nolte CH, et al. Early-onset ALS with long-term survival associated with spastin gene mutation. *Neurology*. 2005 Jul 12;65(1):141-3. doi: 10.1212/01.wnl.0000167130.31618.0a.
148. Montuschi A, Iazzolino B, Calvo A, Moglia C, Lopiano L, Restagno G, et al. Cognitive correlates in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study in Italy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015 Feb;86(2):168-73. doi: 10.1136/jnnp-2013-307223.
149. Morahan JM, Yu B, Trent RJ, Pamphlett R. A gene-environment study of the paraoxonase 1 gene and pesticides in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology*. 2007 May;28(3):532-40. doi: 10.1016/j.neuro.2006.11.007.
150. Müller K, Brenner D, Weydt P, Meyer T, Grehl T, Petri S et al; German ALS network MND-NET. Comprehensive analysis of the mutation spectrum in 301 German ALS families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Aug;89(8):817-827. doi: 10.1136/jnnp-2017-317611.
151. Münch C, Rolfs A, Meyer T. Heterozygous S44L missense change of the spastin gene in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*.2008Aug;9(4):251-3.doi:10.1080/17482960801900172
152. Münch C, O'Brien J, Bertolotti A. (2011). Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(9), 3548–3553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017275108>
153. Murphy NA, Arthur KC, Tienari PJ, Houlden H, Chió A, Traynor BJ. Age-related penetrance of the C9orf72 repeat expansion. *Sci Rep* 7, 2116 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02364-1>

154. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006 Oct 6;314(5796):130-3. doi: 10.1126/science.1134108.
155. Neuwirth C, Barkhaus PE, Burkhardt C, Castro J, Czell D, de Carvalho M et al. (2017). Motor Unit Number Index (MUNIX) detects motor neuron loss in pre-symptomatic muscles in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 128(3), 495–500. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2016.11.026>
156. Nicolas A, Kenna KP, Renton AE, Ticozzi N, Faghri F, Chia R et al. Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene. *Neuron*. 2018 Mar 21;97(6):1268-1283.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2018.02.027.
157. Nicholson K, Murphy A, McDonnell E, Shapiro J, Simpson E, Glass J, et al. (2018). Improving symptom management for people with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve*, 57(1), 20–24. <https://doi.org/10.1002/mus.25712>
158. Oeckl P, Jardel C, Salachas F, Lamari F, Andersen PM, Bowser R, et al. Multicenter validation of CSF neurofilaments as diagnostic biomarkers for ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2016 Jul-Aug;17(5-6):404-13. doi: 10.3109/21678421.2016.1167913.
159. Oh SI, Park A, Kim HJ, Oh KW, Choi H, Kwon MJ, Ki CS, Kim HT, Kim SH. Spectrum of cognitive impairment in Korean ALS patients without known genetic mutations. *PLoS One*. 2014 Feb 3;9(2):e87163. doi: 10.1371/journal.pone.0087163.
160. Ohya J, Chikuda H, Kato S, Hayakawa K, Oka H, Takeshita K, Tanaka S, Ogata T. Elevated levels of phosphorylated neurofilament heavy subunit in the cerebrospinal fluid of patients with lumbar spinal stenosis: preliminary findings. *Spine J*. 2015 Jul 1;15(7):1587-92. doi: 10.1016/j.spinee.2015.03.013
161. Orlacchio A, Babalini C, Borreca A, Patrono C, Massa R, Basaran S, et al. SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2010 Feb;133(Pt 2):591-8. doi: 10.1093/brain/awp325.
162. Osmanovic A, Rangnau I, Kosfeld A, Abdulla S, Janssen C, Auber B et al. FIG4 variants in central European patients with amyotrophic lateral sclerosis: a whole-exome and targeted sequencing study. *Eur J Hum Genet*. 2017 Feb;25(3):324-331. doi: 10.1038/ejhg.2016.186.

163. Paganoni S, Macklin EA, Lee A, Murphy A, Chang J, Zipf A, et al. Diagnostic timelines and delays in diagnosing amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014;15(5-6):453-6.
164. Paipa AJ, Povedano M, Barcelo A, Domínguez R, Saez M, Turon J, et al. (2019). Survival benefit of multidisciplinary care in amyotrophic lateral sclerosis in Spain: association with noninvasive mechanical ventilation. *Journal of multidisciplinary healthcare*, 12, 465–470. <https://doi.org/10.2147/JMDH.S205313>
165. Pecoraro V, Mandrioli J, Carone C, Chiò A, Traynor BJ, Trenti T. The NGS technology for the identification of genes associated with the ALS. A systematic review. *Eur J Clin Invest.* 2020 May;50(5):e13228. doi: 10.1111/eci.13228.
166. Peters S, Visser AE, D'Ovidio F, Vlaanderen J, Portengen L, Beghi E, et al; Euro-MOTOR consortium. Effect modification of the association between total cigarette smoking and ALS risk by intensity, duration and time-since-quitting: Euro-MOTOR. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020 Jan;91(1):33-39. doi: 10.1136/jnnp-2019-320986.
167. Pfeiffer RM, Mayer B, Kuncl RW, Check DP, Cahoon EK, Rivera DR, et al. Identifying potential targets for prevention and treatment of amyotrophic lateral sclerosis based on a screen of medicare prescription drugs. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2020 May;21(3-4):235-245. doi: 10.1080/21678421.2019.1682613.
168. Phukan J, Elamin M, Bede P, Jordan N, Gallagher L, Byrne S, Lynch C, et al. The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012 Jan;83(1):102-8. doi: 10.1136/jnnp-2011-300188.
169. Pinto S, Swash M, de Carvalho M (2014) Does surgery accelerate progression of amyotrophic lateral sclerosis? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85(6):643-646. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-305770>
170. Poesen K, De Schaepdryver M, Stubendorff B et al. Neurofilament markers for ALS correlate with extent of upper and lower motor neuron disease. *Neurology.* 2017 Jun 13;88(24):2302-2309. doi: 10.1212/WNL.0000000000004029
171. Poesen K, Van Damme P. Diagnostic and Prognostic Performance of Neurofilaments in ALS. *Front Neurol.* 2019 Jan 18;9:1167. doi: 10.3389/fneur.2018.01167
172. Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, Liang TY et al. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal

- vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci.* 2011 Apr;14(4):459-68. doi: 10.1038/nn.2779.
173. Porta S, Xu Y, Restrepo CR, Kwong LK, Zhang B, Brown HJ, et al. Patient-derived frontotemporal lobar degeneration brain extracts induce formation and spreading of TDP-43 pathology in vivo. *Nat Commun.* 2018 Oct 11;9(1):4220. doi: 10.1038/s41467-018-06548-9.
174. Porta S, Xu Y, Lehr T, Zhang B, Meymand E, Olufemi M, et al. Distinct brain-derived TDP-43 strains from FTLTD-TDP subtypes induce diverse morphological TDP-43 aggregates and spreading patterns in vitro and in vivo. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2021 Dec;47(7):1033-1049. doi: 10.1111/nan.12732.
175. Pottier C, Rampersaud E, Baker M, Wu G, Wu J, McCauley JL et al. Identification of compound heterozygous variants in OPTN in an ALS-FTD patient from the CReATe consortium: a case report. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2018 Aug;19(5-6):469-471. doi: 10.1080/21678421.2018.1452947.
176. Prasad A, Bharathi V, Sivalingam V, Girdhar A, Patel BK. Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci.* 2019 Feb 14;12:25. doi: 10.3389/fnmol.2019.00025.
177. Ranganathan R, Haque S, Coley K, Shepherd S, Cooper-Knock J, Kirby J. Multifaceted Genes in Amyotrophic Lateral Sclerosis-Frontotemporal Dementia. *Front Neurosci.* 2020 Jul 7;14:684. doi: 10.3389/fnins.2020.00684.
178. Ratti A, Buratti E. Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *J Neurochem.* 2016 Aug;138 Suppl 1:95-111. doi: 10.1111/jnc.13625.
179. Ratti A, Peverelli S, D'Adda E, Colombrita C, Gennuso M, Prella A, Silani V. Genetic and epigenetic disease modifiers in an Italian C9orf72 family expressing ALS, FTD or PD clinical phenotypes. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2022 May;23(3-4):292-298. doi: 10.1080/21678421.2021.1962355.
180. Ravits JM, Paul P, Jorg C. Focality of upper and lower motor neuron degeneration at the clinical onset of ALS. *Neurology.* 2007 May 8;68(19):1571-5. doi: 10.1212/01.wnl.0000260965.20021.47.
181. Ravits JM, La Spada AR. ALS motor phenotype heterogeneity, focality, and spread: deconstructing motor neuron degeneration. *Neurology.* 2009 Sep 8;73(10):805-11. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181b6bbbd.

182. Reiber H. Quantitative Bestimmung der lokal im Zentralnervensystem synthetisierten Immunglobulin G-Fraktion des Liquors [Calculation of the IgG fraction of cerebrospinal fluid locally synthesized in the central nervous system (author's transl)]. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1979 Sep;17(9):587-91. German.
183. Reyes-Leiva D, Dols-Icardo O, Sirisi S, Cortés-Vicente E, Turon-Sans J, de Luna N, et al. Pathophysiological Underpinnings of Extra-Motor Neurodegeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis: New Insights From Biomarker Studies. *Front Neurol.* 2022 Jan 18;12:750543. doi: 10.3389/fneur.2021.750543.
184. Richards D, Morren JA, Piro EP. Time to diagnosis and factors affecting diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2020;417:117054.
185. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
186. Riggs JE. Longitudinal Gompertzian analysis of amyotrophic lateral sclerosis mortality in the U.S., 1977-1986: evidence for an inherently susceptible population subset. *Mech Ageing Dev.* 1990 Sep;55(3):207-20. doi: 10.1016/0047-6374(90)90149-a.
187. Riku Y, Atsuta N, Yoshida M, Tatsumi S, Iwasaki Y, Mimuro M et al. Differential motor neuron involvement in progressive muscular atrophy: a comparative study with amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open.* 2014 May 14;4(5):e005213. doi: 10.1136/bmjopen-2014-005213. PMID: 24833696; PMCID: PMC4025414.
188. Riva N, Pozzi L, Russo T, Pipitone GB, Schito P, Domi T et al. NEK1 Variants in a Cohort of Italian Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurosci.* 2022 Apr 14;16:833051. doi: 10.3389/fnins.2022.833051
189. Robberecht W, Aguirre T, Van den Bosch L, Tilkin P, Cassiman JJ, Matthijs G. D90A heterozygosity in the SOD1 gene is associated with familial and apparently sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 1996 Nov;47(5):1336-9. doi: 10.1212/wnl.47.5.1336.
190. Roberts AL, Johnson NJ, Cudkovicz ME, Eum KD, Weisskopf MG. Job-related formaldehyde exposure and ALS mortality in the USA. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016 Jul;87(7):786-8. doi: 10.1136/jnnp-2015-310750.



191. Rosenbohm A, Peter RS, Erhardt S, Lulé D, Rothenbacher D, Ludolph AC et al. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Southern Germany. *J Neurol* 264, 749–757 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8413-3>
192. Ross JP, Leblond CS, Laurent SB, Spiegelman D, Dione-Laporte A, Camu W et al. Oligogenicity, C9orf72 expansion, and variant severity in ALS. *Neurogenetics*. 2020 Jul;21(3):227-242. doi: 10.1007/s10048-020-00612-7.
193. Rossi D, Volanti P, Brambilla L, Colletti T, Spataro R, La Bella V. CSF neurofilament proteins as diagnostic and prognostic biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2018 Mar;265(3):510-521. doi: 10.1007/s00415-017-8730-6
194. Saeed M, Siddique N, Hung WY, Usacheva E, Liu E, Sufit RL et al. (2006). Paraoxonase cluster polymorphisms are associated with sporadic ALS. *Neurology*, 67(5), 771–776. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000227187.52002.88>
195. Sanderson AB, Arnold WD, Elsheikh B, Kissel JT (2015) The clinical spectrum of isolated peripheral motor dysfunction. *Muscle Nerve* 51(3):358-362. <https://doi.org/10.1002/mus.24326>
196. Scarlino S, Domi T, Pozzi L, Romano A, Pipitone GB, Falzone YM et al. Burden of Rare Variants in ALS and Axonal Hereditary Neuropathy Genes Influence Survival in ALS: Insights from a Next Generation Sequencing Study of an Italian ALS Cohort. *Int J Mol Sci*. 2020 May 8;21(9):3346. doi: 10.3390/ijms21093346
197. Shojaie A, Al Khleifat A, Opie-Martin S, Sarraf P, Al-Chalabi A. Non-motor symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2024 Feb;25(1-2):61-66. doi: 10.1080/21678421.2023.2263868.
198. Shahim P, Norato G, Sinaii N, Zetterberg H, Blennow K, Chan L et al. (2024). Neurofilaments in Sporadic and Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Genes*, 15(4), 496. <https://doi.org/10.3390/genes15040496>
199. Shatunov A, Al-Chalabi A. The genetic architecture of ALS. *Neurobiol Dis*. 2021 Jan;147:105156. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105156.
200. Shen D, Cui L, Fang J, Cui B, Li D, Tai H. (2016). Voxel-Wise Meta-Analysis of Gray Matter Changes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in aging neuroscience*, 8, 64. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00064>
201. Schönström N, Willén J. Imaging lumbar spinal stenosis. *Radiol Clin North Am*. 2001 Jan;39(1):31-53, v. doi: 10.1016/s0033-8389(05)70262-1

202. Schreiber S, Spotorno N, Schreiber F, Acosta-Cabronero J, Kaufmann J, Machts J, et al. Significance of CSF NfL and tau in ALS. *J Neurol*. 2018 Nov;265(11):2633-2645. doi: 10.1007/s00415-018-9043-0
203. Simon NG, Ayer G, Lomen-Hoerth C (2013) Is IVIg therapy warranted in progressive lower motor neuron syndromes without conduction block? *Neurology* 81(24):2116–2120.
204. Smethurst P, Risse E, Tyzack GE, Mitchell JS, Taha DM, Chen YR, Newcombe J, Collinge J, Sidle K, Patani R. Distinct responses of neurons and astrocytes to TDP-43 proteinopathy in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2020 Feb 1;143(2):430-440. doi: 10.1093/brain/awz419.
205. Srinivasan J, Scala S, Jones HR, Saleh F & Russell JA. (2006). Inappropriate surgeries resulting from misdiagnosis of early amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve*, 34(3), 359–360. <https://doi.org/10.1002/mus.20555>
206. Steinacker, P., Hendrich, C., Sperfeld, A. D., Jesse, S., von Arnim, C. A., Lehnert S et al. (2008). TDP-43 in cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology*, 65(11), 1481–1487. <https://doi.org/10.1001/archneur.65.11.1481>
207. Steinacker P, Feneberg E, Weishaupt J et al. Neurofilaments in the diagnosis of motoneuron diseases: a prospective study on 455 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 Jan;87(1):12-20. doi: 10.1136/jnnp-2015-311387
208. Strong MJ, Grace GM, Freedman M, Lomen-Hoerth C, Wooley S, Goldstein LH, et al. Consensus criteria for the diagnosis of frontotemporal cognitive and behavioural syndromes in amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2009;10:3, 131-146, DOI: 10.1080/17482960802654364
209. Strong MJ, Abrahams S, Goldstein LH, Woolley S, Mclaughlin P, Snowden J, et al. Amyotrophic lateral sclerosis - frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD): Revised diagnostic criteria. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2017 May;18(3-4):153-174. doi: 10.1080/21678421.2016.1267768.
210. Su FC, Goutman SA, Chernyak S, Mukherjee B, Callaghan BC, Batterman S, et al. Association of Environmental Toxins With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2016 Jul 1;73(7):803-11. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.0594.
211. Swinnen, B., Robberecht, W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 10, 661–670 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.184>

212. Takahashi H, Aoki Y, Nakajima A et al. Axonal damage is remarkable in patients with acutely worsening symptoms of compression myelopathy: biomarkers in cerebrospinal fluid samples. *Eur Spine J*. 2018 Aug;27(8):1824-1830. doi: 10.1007/s00586-018-5549-5.
213. Takeda T, Kitagawa K, Arai K. Phenotypic variability and its pathological basis in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology*. 2020 Feb;40(1):40-56. doi: 10.1111/neup.12606.
214. Talbot K. Amyotrophic lateral sclerosis: cell vulnerability or system vulnerability? *J Anat*. 2014 Jan;224(1):45-51. doi: 10.1111/joa.12107.
215. Tan RH, Kril JJ, Fatima M, McGeachie A, McCann H, Shepherd C, Forrest SL, Affleck A, Kwok JB, Hodges JR, Kiernan MC, Halliday GM. TDP-43 proteinopathies: pathological identification of brain regions differentiating clinical phenotypes. *Brain*. 2015 Oct;138(Pt 10):3110-22. doi: 10.1093/brain/awv220.
216. Teyssou E, Chartier L, Amador MD, Lam R, Lautrette G, Nicol M et al. Novel UBQLN2 mutations linked to amyotrophic lateral sclerosis and atypical hereditary spastic paraplegia phenotype through defective HSP70-mediated proteolysis. *Neurobiol Aging*. 2017 Oct;58:239.e11-239.e20. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.06.018.
217. Timmins HC, Thompson AE, Kiernan MC. Diagnostic criteria for amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2024 Jul 23. doi: 10.1097/WCO.0000000000001302.
218. Trabjerg BB, Garton FC, van Rheenen W, Fang F, Henderson RD et al. (2020). ALS in Danish Registries: Heritability and links to psychiatric and cardiovascular disorders. *Neurology. Genetics*, 6(2), e398.  
<https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000398>
219. Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O. Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes: a population-based study. *Arch Neurol*. 2000 Jan;57(1):109-13. doi: 10.1001/archneur.57.1.109.
220. Tripolszki K, Török D, Goudenège D, Farkas K, Sulák A, Török N, et al. High-throughput sequencing revealed a novel SETX mutation in a Hungarian patient with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav*. 2017 Mar 15;7(4):e00669. doi: 10.1002/brb3.669.
221. Tripolszki K, Gampawar P, Schmidt H, Nagy ZF, Nagy D, Klyvényi P et al. Comprehensive Genetic Analysis of a Hungarian Amyotrophic Lateral Sclerosis Cohort. *Front Genet*. 2019 Aug 16;10:732. doi: 10.3389/fgene.2019.00732.

222. Turner MR, Scaber J, Goodfellow JA, Lord ME, Marsden R, Talbot K. The diagnostic pathway and prognosis in bulbar-onset amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 2010;294(1):81-5.
223. Turner MR, Barnwell J, Al-Chalabi A, Eisen A. Young-onset amyotrophic lateral sclerosis: historical and other observations. *Brain*. 2012 Sep;135(Pt 9):2883-91. doi: 10.1093/brain/aws144
224. Turner MR, Al-Chalabi A, Chio A, Hardiman O, Kiernan MC, Rohrer JD et al. Genetic screening in sporadic ALS and FTD. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017;88:1042–4. doi: 10.1136/jnnp-2017-315995
225. Turner MR; UK MND Clinical Studies Group. Diagnosing ALS: the Gold Coast criteria and the role of EMG. *Pract Neurol*. 2022 Jun;22(3):176-178. doi: 10.1136/practneurol-2021-003256.
226. van Blitterswijk M, Vlam L, van Es MA, van der Pol WL, Hennekam EA, Dooijes D, et al. Genetic overlap between apparently sporadic motor neuron diseases. *PLoS One*. 2012;7(11):e48983. doi: 10.1371/journal.pone.0048983.
227. van Blitterswijk M, van Es MA, Hennekam EA, Dooijes D, van Rheenen W, Medic J et al. Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2012 Sep 1;21(17):3776-84. doi: 10.1093/hmg/dds199.
228. Vande Velde C, Miller TM, Cashman NR, Cleveland DW. (2008). Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 4022–4027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712209105>
229. Van Daele SH, Moisse M, van Vugt JJFA, Zwamborn RAJ, van der Spek R, van Rheenen W, et al. Genetic variability in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2023 Sep 1;146(9):3760-3769. doi: 10.1093/brain/awad120.
230. Van Damme P, Al-Chalabi A, Andersen PM, Chiò A, Couratier P, De Carvalho M, et al. (2024). European Academy of Neurology (EAN) guideline on the management of amyotrophic lateral sclerosis in collaboration with European Reference Network for Neuromuscular Diseases (ERN EURO-NMD). *European journal of neurology*, 31(6), e16264. <https://doi.org/10.1111/ene.16264>
231. van der Burgh, HK, Westeneng HJ, Walhout R, van Veenhuijzen K, Tan HHG, Meier JM et al. (2020). Multimodal longitudinal study of structural brain involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 94(24), e2592–e2604. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000009498>

232. van Es MA, Goedee HS, Westeneng HJ, Nijboer TCW, van den Berg LH. Is it accurate to classify ALS as a neuromuscular disorder? *Expert Rev Neurother*. 2020 Sep;20(9):895-906. doi: 10.1080/14737175.2020.1806061.
233. Van Langenhove T, van der Zee J, Van Broeckhoven C. The molecular basis of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum. *Ann Med*. 2012 Dec;44(8):817-28. doi: 10.3109/07853890.2012.665471.
234. van Rheenen W, Shatunov A, Dekker AM, McLaughlin RL, Diekstra FP, Pulit SL, et al. Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2016 Sep;48(9):1043-8. doi: 10.1038/ng.3622.
235. van Rheenen W, van der Spek RAA, Bakker MK, van Vugt JJFA, Hop PJ, Zwamborn RAJ, et al. Common and rare variant association analyses in amyotrophic lateral sclerosis identify 15 risk loci with distinct genetic architectures and neuron-specific biology. *Nat Genet*. 2021 Dec;53(12):1636-1648. doi: 10.1038/s41588-021-00973-1.
236. Van Weehaeghe D, Ceccarini J, Delva A, Robberecht W, Van Damme P, Van Laere K. (2016). Prospective Validation of 18F-FDG Brain PET Discriminant Analysis Methods in the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 57(8), 1238–1243. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.166272>
237. Vasta R, Chia R, Traynor BJ, Chiò A. Unraveling the complex interplay between genes, environment, and climate in ALS. *EBioMedicine*. 2022 Jan;75:103795. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103795.
238. Verbeeck C, Deng Q, Dejesus-Hernandez M, Taylor G, Ceballos-Diaz C, Kocerha J, et al. Expression of Fused in sarcoma mutations in mice recapitulates the neuropathology of FUS proteinopathies and provides insight into disease pathogenesis. *Mol Neurodegener*. 2012 Oct 10;7:53. doi: 10.1186/1750-1326-7-53.
239. Visser J, van den Berg-Vos RM, Franssen H, van den Berg LH, Wokke JH, de Jong JM et al. Disease course and prognostic factors of progressive muscular atrophy. *Arch Neurol*. 2007 Apr;64(4):522-8. doi: 10.1001/archneur.64.4.522. PMID: 17420313.
240. Vucic S, Kiernan MC (2006). Novel threshold tracking techniques suggest that cortical hyperexcitability is an early feature of motor neuron disease. *Brain : a journal of neurology*, 129(Pt 9), 2436–2446. <https://doi.org/10.1093/brain/awl172>

241. Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C, Wiskow O, Han SS, Sandoe J et al. (2014). Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.019>
242. Wang H, O'Reilly ÉJ, Weisskopf MG, Logroscino G, McCullough ML, Thun MJ, Schatzkin A, Kolonel LN, Ascherio A. Smoking and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a pooled analysis of 5 prospective cohorts. *Arch Neurol*. 2011 Feb;68(2):207-13. doi: 10.1001/archneurol.2010.367.
243. Wang MD, Little J, Gomes J, Cashman NR, Krewski D. Identification of risk factors associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. *Neurotoxicology*. 2017 Jul;61:101-130. doi: 10.1016/j.neuro.2016.06.015.
244. Westeneng HJ, Walhout R, Straathof M, Schmidt R, Hendrikse J, Veldink JH, van den Heuvel MP, van den Berg LH. Widespread structural brain involvement in ALS is not limited to the C9orf72 repeat expansion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 Dec;87(12):1354-1360. doi: 10.1136/jnnp-2016-313959.
245. Westeneng HJ, Debray TPA, Visser AE, van Eijk RPA, Rooney JPK, Calvo A, et al. Prognosis for patients with amyotrophic lateral sclerosis: development and validation of a personalised prediction model. *Lancet Neurol*. 2018 May;17(5):423-433. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30089-9.
246. Wiesenfarth M, Günther K, Müller K, Witzel S, Weiland U, Mayer K et al. Clinical and genetic features of amyotrophic lateral sclerosis patients with C9orf72 mutations. *Brain Commun*. 2023 Mar 21;5(2):fcad087. doi: 10.1093/braincomms/fcad087.
247. Wilke C, Pujol-Calderón F, Barro C et al. Correlations between serum and CSF pNfH levels in ALS, FTD and controls: a comparison of three analytical approaches. *Clin Chem Lab Med*. 2019 Sep 25;57(10):1556-1564. doi: 10.1515/cclm-2019-0015.
248. Wilkinson, D. Stochastic modelling for quantitative description of heterogeneous biological systems. *Nat Rev Genet* 10, 122–133 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrg2509>.
249. Witzel S, Mayer K, Oeckl P. (2022). Biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Current opinion in neurology*, 35(5), 699–704. doi:10.1097/WCO.0000000000001094.
250. Xu L, Liu T, Liu L, Yao X, Chen L, Fan D, Zhan S, Wang S. Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*. 2020 Apr;267(4):944-953. doi: 10.1007/s00415-019-09652-y.

251. Yilmaz R, Grehl T, Eckrich L, Marschalkowski I, Weishaupt K, Valkadinov I, et al. Frequency of C9orf72 and SOD1 mutations in 302 sporadic ALS patients from three German ALS centers. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2023 Aug;24(5-6):414-419. doi: 10.1080/21678421.2023.2165946.
252. Zamani A, Thomas E, Wright DK. Sex biology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ageing Res Rev.* 2024 Mar;95:102228. doi: 10.1016/j.arr.2024.102228.
253. Zeng P, Zhou X. Causal effects of blood lipids on amyotrophic lateral sclerosis: a Mendelian randomization study. *Hum Mol Genet.* 2019 Feb 15;28(4):688-697. doi: 10.1093/hmg/ddy384.
254. Zou ZY, Zhou ZR, Che CH, Liu CY, He RL, Huang HP. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017 Jul;88(7):540-549. doi: 10.1136/jnnp-2016-315018.

## 10. SEZNAM PUBLIKACÍ

### 1. Původní vědecké práce, které jsou podkladem této disertační práce

#### a) s IF

1. **Baumgartner D**, Mazanec R, Hanzalová J. Diagnostic utility of neurofilament markers for MND is limited in restricted disease phenotype and for differentiation from compressive myeloradiculopathies. *J Neurol*. 2023 Mar;270(3):1600-1614. doi: 10.1007/s00415-022-11504-1. **IF<sub>2023</sub> = 4,8**
2. **Baumgartner D**, Mušová Z, Zídková J, Hedvičáková P, Vlčková E, Joppeková L, Kramářová T, Fajkusová L, Stránecký V, Geryk J, Votýpka P, Mazanec R. Genetic Landscape of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Czech Patients. *J Neuromuscul Dis*. 2024 Jul 25. doi: 10.3233/JND-230236. **IF<sub>2024</sub> = 3,2**

#### b) bez IF

3. **Baumgartner D**. ALS jako TDP43-proteinopatie: kognitivní poruchy u ALS, *ALS Plus. Neurol. praxi*. 2016;17(6):366-369 | DOI: 10.36290/neu.2016.077

### 2. Původní vědecké práce s, které nejsou podkladem disertační práce

#### a) s IF

1. Potockova V, Mala S, Hoskocova L, Capek V, Nedelka T, Riedlbauchova L, **Baumgartner D**, Mensova L, Mazanec R. Thermal quantitative sensory testing as a screening tool for cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus. *Brain Behav*. 2022 Mar;12(3):e2506. doi: 10.1002/brb3.2506. **IF<sub>2021-2022</sub> = 2,078**
2. Potočková V, Malá Š, Tomek A, **Baumgartner D**, Mazanec R. Význam testování termických prahů v detekci neuropatie tenkých vláken u diabetiků 1. typu. *Cesk Slov Neurol N. Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/112(6): 692-697. **IF<sub>2016</sub> = 0,368**
3. **Baumgartner D**, Marusič P, Mazanec R. Kmenové buňky v léčbě amyotrofické laterální sklerózy – přehled současných klinických zkušeností. *Cesk Slov Neurol N* 2017; 80/113(1): 27-33. doi: 10.14735/amcsnn201727 **IF<sub>2017</sub> = 0,508**
4. Mensová L, **Baumgartner D**, Potočková V, Mazanec R. Pletencové svalové dystrofie. *Minimonografie. Cesk Slov Neurol N* 2022; 85(6): 435-448 <https://doi.org/10.48095/cccsnn2022435> **IF<sub>2022</sub> = 0,5**



**b) bez IF**

1. kolektivní monografie Vondra V, Vízek M, Doušová T, Pohunek P, Drábková J, Chlumský J, Kölbl F, Fila L, Koblížek V, Neumannová K, Charvát J, Stejskal R, Hoffmann R, Magerová H, **Baumgartner D**, et al.. Dušnost : problém mnoha oborů . Praha: Mladá fronta, 2017, 262 s. ISBN 978-80-204-4610-7.
2. Mazanec R, Neupauerová J, **Baumgartner D**, Potočková V, Laššuthová P, Šafka-Brožková D, Seeman P. Hereditární motorické neuropatie. Neurol. praxi. 2016;17(6):354-358 | DOI: 10.36290/neu.2016.074
3. Mazanec R, **Baumgartner D**, Potočková V. Toxické neuropatie. Neurol. praxi. 2017;18(1):20-24 | DOI: 10.36290/neu.2017.059
4. Mazanec R, Mensová L, **Baumgartner D**, Potočková V, Zámečník J. Diagnostický algoritmus u svalových dystrofií. Neurol. praxi. 2019;20(3):190-194 | DOI: 10.36290/neu.2019.017
5. Mensová L, **Baumgartner D**. Muž, který se nemohl ponořit – kazuistika pacienta s typickým průběhem pozdní formy Pompeho nemoci. Neurol. praxi. 2024;25(1):74-78 | DOI: 10.36290/neu.2024.003

## 11. PŘÍLOHY

Dosud nevalidovaná, nepublikovaná česká verze ALS-FRS-R škály (autorem doc. MUDr. Eva Vlčková, Ph.D. a kolektiv; Neurologická klinika LF MU a FN Brno)

### Česká verze ALS Functional Rating Scale Revised (ALS-FRS-R)

**Jméno pacienta:** \_\_\_\_\_ **Datum vyplnění:** \_\_\_\_\_  
**Způsob administrace = vyplňuje vyšetřující na základě rozhovoru s pacientem**

**Bod 1: Řeč**

- 4  Normální řeč
- 3  Detekovatelná porucha řeči
- 2  Řeč srozumitelná až při opakování
- 1  Řeč kombinovaná s nehlasovou komunikací
- 0  Ztráta užitečné řeči

**Bod 2: Slinění**

- 4  Normální
- 3  Mírný, ale zřetelný nadbytek slin v ústech; v noci možné vytékání slin
- 2  Střední nadbytek slin v ústech; možné minimální vytékání slin během dne
- 1  Výrazný nadbytek slin s vytékáním
- 0  Výrazné vytékání slin; vyžaduje neustálé používání kapesníku

**Bod 3: Polykání**

- 4  Normální konzumace jídla
- 3  Počínající problémy s konzumací – občasné zakuckání
- 2  Nutné změny v konzistenci stravy
- 1  Nutné doplňkové podávání výživy sondou
- 0  Nic per os (výhradně parenterální nebo enterální výživa)

**Bod 4: Psaní rukou**

- 4  Normální
- 3  Pomalé nebo neúhledné, ale všechna slova jsou čitelná
- 2  Ne všechna slova jsou čitelná
- 1  Dokáže uchopit pero, ale ne psát
- 0  Nedokáže uchopit pero

**Bod 5a: Krájení potravy a používání příboru**

**Pozn. Bod je určen pro pacienty bez gastrostomie nebo pro pacienty s gastrostomií, u nichž je cestou gastrostomie podáváno méně než 50 % výživy.**

**Pokud se více než 50 % výživy podává gastrostomickou sondou, přejděte k bodu 5b.**

- 4  Normální
- 3  Počíná si poněkud nemotorně a pomalu, ale zvládá bez pomoci
- 2  Zvládá nakrájet většinu jídla (>50 %), i když pomalu a nemotorně; potřebuje určitou pomoc
- 1  Dokáže se pomalu najíst, ale jídlo musí nakrájet někdo jiný
- 0  Musí být krměn(a)

**Bod 5b: Obsluha gastrostomické sondy.**

**Pozn. Bod je určen pro pacienty se zavedenou gastrostomií, která u nich slouží jako primární metoda příjmu potravy (tzn. touto cestou je podáváno více než 50 % výživy).**

- 4  Normální
- 3  Počíná si nemotorně, ale dokáže provést veškeré úkony související s obsluhou sondy samostatně
- 2  Potřebuje určitou pomoc s uzávěrem gastrostomie a upevňujícími prvky
- 1  Pečovatel pomáhá jen minimálně
- 0  Nedokáže provést žádnou část úkonu

**Bod 6: Oblékání a osobní hygiena**

- 4  Normální
- 3  Samostatná a úplná sebeobsluha se zvýšeným úsilím anebo sníženou efektivitou
- 2  Nutná občasná asistence nebo alternativní postup
- 1  K péči o sebe potřebuje ošetřovatele
- 0  Úplná závislost

**Bod 7: Otáčení na lůžku a úprava ložního prádla**

- 4  Normální
- 3  Poněkud pomalé a nemotorné, ale zvládá bez pomoci
- 2  Zvládne se samostatně otočit nebo si upravit přikrývku, ale s velkými obtížemi
- 1  Zvládne začít, ale sám se neotočí ani si neupraví přikrývku
- 0  Bezmocný

**Bod 8: Chůze**

- 4  Normální
- 3  Počínající potíže s chůzí
- 2  Chůze s asistencí
- 1  Schopnost aktivního pohybu dolními končetinami, ale nikoli chůze
- 0  Neschopnost účelného pohybu dolními končetinami

**Bod 9: Chůze do schodů**

- 4  Normální
- 3  Pomalá
- 2  Mírná nestabilita nebo únava
- 1  Potřebuje pomoc
- 0  Nevládne

**Bod 10: Dušnost**

- 4  Není
- 3  Při chůzi
- 2  Při jedné nebo více z následujících každodenních činností: stravování, koupání, oblékání
- 1  V klidu: dýchací potíže při sezení nebo ležení
- 0  Závažné obtíže: zvažuje se mechanická ventilační podpora

**Bod 11: Ortopnoe**

- 4  Není
- 3  Určité obtíže s nočním spánkem kvůli dušnosti; běžně nepoužívá více než dva polštáře
- 2  Ke spánku potřebuje více než dva polštáře
- 1  Může spát jen v sedě
- 0  Nemůže spát bez mechanické ventilační podpory

**Bod 12: Respirační insuficience**

- 4  Žádná
- 3  Intermittentní používání BiPAP (bilevel positive airway pressure = druh mechanické ventilace, při které pacient dýchá samovolně a výměna vzduchu je usnadněna kontinuálním působením tlaku, který se do plic přenáší pomocí nazální nebo nazoorální masky)
- 2  Kontinuální používání BiPAP přes noc
- 1  Kontinuální používání BiPAP přes noc i den
- 0  Invazivní mechanická ventilace intubací nebo přes tracheostomii