

Poměr fosforylovaného tau proteinu k beta amyloidu v likvoru predikuje pozitivitu amyloidové PET

Cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein and beta amyloid predicts amyloid PET positivity

Souhrn

Cíl: Současná diagnostická kritéria Alzheimerovy nemoci zdůrazňují vedle klinické diagnózy také vyšetření metabolických biomarkerů. V ČR je dostupné vyšetření pomocí amyloidové PET a vyšetření biomarkerů v likvoru (hladiny beta amyloidu A β 1-42, celkového tau a fosforylovaného tau 181). Cílem této studie bylo zhodnotit konkordanci amyloidové PET a biomarkerů v likvoru v klinických podmínkách a navrhnout způsob interpretace výsledků likvoru ke zlepšení predikce výsledku amyloidové PET především u rozporných případů. **Metodika:** Celkem 103 pacientů podstoupilo neuropsychologické vyšetření, MR mozku, vyšetření biomarkerů v likvoru a vizuálně hodnocenou PET s flutemetamolem. Následně byly srovnány konkordance výsledků biomarkerů likvoru a PET a byla vypočítána optimální hraniční hodnota pro poměr beta amyloidu 1-42 a fosforylovaného tau proteinu. **Výsledky:** Výsledek PET byl konkordantní s vyšetřením beta amyloidu 1-42 v likvoru v 79 %, s výsledkem fosforylovaného tau v 72 %. Ve 40 % byl rozporný výsledek mezi biomarkery v likvoru vzájemně. Mezi PET pozitivními a negativními pacienty nejlépe rozlišoval poměr beta amyloidu 1-42 a fosforylovaného tau (AUC = 0,938, 95% CI = 0,890–0,986; $p < 0,001$), kdy hraniční hodnota 9,47 měla senzitivitu 91 % a specifitu 91,3 %. **Závěr:** Obě metody vykazují dobrou vzájemnou diagnostickou shodu. V případě rozporných nálezů v likvoru doporučujeme využít poměrné hodnoty beta amyloidu 1-42 a fosforylovaného tau.

Abstract

Aim: Current diagnostic criteria for Alzheimer's disease shift the focus from clinical findings to metabolic biomarkers. Most widely used metabolic biomarkers in the Czech Republic are cerebrospinal fluid levels of beta amyloid 1-42, total tau, and phosphorylated tau 181, as well as amyloid PET. Our aim was to investigate the concordance of amyloid PET and cerebrospinal fluid biomarkers in clinical settings and propose a way of interpreting cerebrospinal fluid biomarker results in order to better predict the amyloid PET status in contradictory cases. **Methods:** A total of 103 patients underwent neuropsychological assessment, brain MRI, visually evaluated flutemetamol amyloid PET and examination of biomarkers in the cerebrospinal fluid. Concordance of amyloid PET and cerebrospinal fluid biomarkers was compared and subsequent optimal cut-off for the beta amyloid 1-42 and phosphorylated tau protein ratio was calculated. **Results:** Concordance between amyloid PET and beta amyloid 1-42 was 79%, followed by phosphorylated tau protein (72%). In 40% of cases, the results of cerebrospinal fluid biomarkers was contradictory. Beta amyloid 1-42 and phosphorylated tau protein ratio was found to best discriminate between amyloid PET positive and negative patients (AUC = 0.938, 95% CI = 0.890–0.986; $P < 0.001$). Ratio of 9.47 provided 91.0% sensitivity and 91.3% specificity. **Conclusion:** Both methods show good diagnostic concordance. In case of contradictory cerebrospinal fluid biomarkers, we encourage using the beta amyloid 1-42 and phosphorylated tau protein ratio.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

J. Cerman^{1,2}, J. Laczó^{1,2},
M. Vyhnálek^{1,2}, J. Malinovská¹,
J. Hanzalová¹, J. Hort^{1,2}

¹ Neurologická klinika 2. LF UK
a FN Motol, Praha

² Mezinárodní centrum klinického
výzkumu, FN u sv. Anny v Brně



MUDr. Jiří Cerman, Ph.D.
Neurologická klinika
2. LF UK a FN Motol
V Úvalu 84
150 06 Praha
e-mail: cermanjiri@gmail.com

Přijato k recenzi: 27. 6. 2019

Přijato do tisku: 27. 2. 2020

Klíčová slova

Alzheimerova nemoc – amyloidová PET – biomarkery – likvor – flutemetamol – beta amyloid A β 1-42 – tau protein

Key words

Alzheimer's disease – amyloid PET – biomarkers – cerebrospinal fluid – flutemetamol – beta amyloid A β 1-42 – tau protein

Úvod

Časná a přesná diferenciální diagnostika neurodegenerativních onemocnění je v současnosti v popředí zájmu oboru neurologie a bude nabývat na významu v souvislosti se zvyšující se prevalencí těchto nemocí u stárnoucí populace. Současná diagnostická kritéria pro Alzheimerovu nemoc (AN) kladou vedle klinické diagnózy stále větší důraz na vyšetření biomarkerů [1]. Zařazení metabolických biomarkerů do diagnostických kritérií umožňuje diagnostikovat AN časněji, již ve stadiu mírné kognitivní poruchy (mild cognitive impairment; MCI) [2], subjektivního kognitivního poklesu (subjective cognitive decline; SCD) nebo i v dřívějších fázích – preklinického stadia. Současně umožňuje diagnostikovat atypické formy AN ve stadiu demence. Vyšetření biomarkerů u atypických případů uvádějí i česká doporučení [3,4]. Nově byla popsána také jednotka LATE (limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy), která by mohla zahrnovat část pro AN sice typických klinických nálezů a nálezu na MR, které jsou však v rozporu s negativním výsledkem metabolických biomarkerů [5]. Na základě současných teoretických modelů onemocnění je možné očekávat pozitivitu biomarkerů již 10–15 let před výskytem prvních klinických příznaků [6].

V roce 2018 vznikla konsenzuální iniciativa [7] a snaha předních světových odborníků na AN definovat toto onemocnění nikoli klinicky, ale pouze biologicky na základě biomarkerů. Nová výzkumná diagnostická kritéria posuzují jejich pozitivitu pomocí systému ATN, kde A značí přítomnost agregovaného beta amyloidu (A β) na PET, popř. sníženou hladinu A β 42 nebo patologický poměr A β 1-42/A β 1-40 v likvoru, T značí zvýšenou hladinu fosforylovaného tau proteinu v likvoru nebo přítomnost patologických depozit tau proteinu na PET a N známky neurodegenerace, např. atrofii na strukturálních zobrazovacích metodách nebo zvýšení celkového tau proteinu v likvoru. Tento systém tvoří kontinuum, kde AN je definována pouze přítomností patologických A β a tau proteinů bez ohledu na klinické obtíže pacienta. Ačkoli tato diagnostická kritéria jsou zejména výzkumná a jejich primárním cílem je umožnit klinické studie nových léků, lze očekávat, že budou pronikat do klinické praxe a v případě úspěchů se uplatní i v léčbě AN (monoklonální protilátky, vakcína, inhibitory enzymů podílejících se na tvorbě patologických proteinů).

Přesná diferenciální diagnostika neurodegenerativních onemocnění je významná také z důvodu informování pacienta o prognóze onemocnění a dle našich klinických zkušeností též vede k větší ochotě dodržovat možná preventivní opatření zvláště u relativně mladých pacientů či pacientů v časném stadiu (léčba interních rizikových faktorů, fyzická a duševní aktivita, úprava stravovacích návyků atd.). Diagnóza, která se neopírá o biomarkery, může být zavádějící či chybná. Jak ukázaly retrospektivní studie [8], i na zahraničních pracovištích s dlouholetou zkušeností v diagnostice AN se senzitivita klinické diagnózy v porovnání s patologickou pohybovala mezi 70,9–87,3 % a specifická dokonce mezi 44,3–70,8 %. Zařazení falešně pozitivních (A β negativních) pacientů se navíc pravděpodobně podílelo na selhání klinických studií s novými léčivými [9,10]. Současné klinické studie tak již v naprosté většině případů vyžadují pozitivní výsledek biomarkerů AN jako základní vstupní kritérium.

Nejčastěji používanými metabolickými biomarkery jsou hladiny beta amyloidu A β 1-42, celkového tau (t-tau) a fosforylovaného tau 181 (p-tau) proteinu v likvoru. Ze zobrazovacích vyšetření je v ČR od roku 2015 klinicky dostupná amyloidová PET s využitím flutemetamolu, který je z radiofarmak logisticky nejdostupnější. Mezi další radiofarmaka schválená k diagnostice AN patří ještě florbetaben a florbetapir. Amyloidová PET je v ČR plně hrazena z veřejného zdravotního pojištění, pokud pacient splňuje indikační kritéria stanovená Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL). Vyšetření musí indikovat vybraná pracoviště se zkušeností v diagnostice AN a u pacienta musí být prokázáno narušení kognitivních funkcí v neuropsychologických testech. U pacientů, u kterých je prokázána diagnóza AN na základě platných kritérií [1], a u asymptomatických jedinců vyšetření uhradit nelze [11].

Vyšetření metabolických biomarkerů v likvoru je ve srovnání s amyloidovou PET pro superkonziliární centra v ČR dostupnější metodou. Jedná se o relativně levné, avšak invazivní vyšetření, určitou nevýhodou také může být obtížná standardizace metody, která se projevuje velkou variabilitou výsledků mezi laboratořemi i různými kity [12–14]. Amyloidová PET má v porovnání s histopatologickou diagnózou dobrou senzitivitu a specifitu [15–17] a při vizuálním čtení i dobrou shodu mezi hodnotiteli [18]. Nevýhodou je vysoká cena vyšetření: cca 45 000 Kč za individuálně připravovanou

látku flutemetamol, dále pak je nutno připočítat cca 14 500 bodů za využití PET/CT (hodnoty platné k červnu 2019).

Obě metody – amyloidová PET i vyšetření biomarkerů v likvoru – sledují obdobný patofyziologický proces, ačkoli amyloidová PET zobrazuje agregovaný kortikální A β , zatímco analýza likvoru stanovuje rozpustný A β . Recentní práce ovšem ukazují, že obě formy A β spolu velmi úzce souvisejí [19].

V ideálním případě je tedy snaha dosáhnout mezi výsledky biomarkerů co nejvyšší diagnostické shody. V praxi se pro hodnocení této shody používá procentuální hodnota konkordance. Předchozí studie udávají konkordanci amyloidové PET a A β 1-42 mezi 60–84 % [20,21], avšak jako radiofarmakum byla v těchto studiích použita Pittsburská substance B, která je z důvodu rychlého poločasu rozpadu obtížně využitelná v klinické praxi. Radiofarmakum flutemetamol, které je v ČR klinicky nejdostupnější a nejpoužívanější, bylo využito ve švédské studii BioFINDER. Dle nedávno publikovaných výsledků prokázala tato studie konkordanci výsledku amyloidové PET a A β 1-42 mezi 74,6–84,4 % [22], pro analýzu likvoru však byly využity elektrochemiluminiscenční kity (metoda ECLIA), které nejsou v ČR zatím dostupné, a kohorta se skládala výhradně z pacientů s SCD a MCI. Zatím není k dispozici studie, která by porovnávala diagnostickou shodu amyloidové PET a biomarkerů v likvoru u pacientů s podezřením na AN v klinických podmínkách specifických pro ČR, kde je amyloidová PET plně hrazena ze zdravotního pojištění, nicméně pouze u pacientů s nejasnou klinickou diagnózou či atypickou prezentací onemocnění.

Cíle této studie byly: 1. zhodnotit konkordanci vizuálně hodnocené flutemetamolové amyloidové PET a biomarkerů v likvoru v klinických podmínkách; 2. navrhnout způsob interpretace nekonkordantních výsledků v likvoru.

Metodika

Charakteristika kohorty

Studie se zúčastnilo celkem 103 pacientů s MCI nebo lehkou demencí klasifikovanou jako „možnou“ AN dle kritérií National Institute on Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA) [1], kteří byli vyšetřeni na Neurologické klinice 2. LF UK a FN Motol v období mezi roky 2016–2018 v rámci Kognitivního centra. Pacienti s MCI byli klasifikováni na základě doporučení NIA-AA [2]. Účastníci stu-

die byli referováni k superkonziliárnímu vyšetření ambulantními neurology nebo psychiatry či se přímo obrátili s žádostí o vyšetření na naše pracoviště, často na doporučení praktického lékaře. Diagnostická kategorie „možná AN“ umožňuje dle kritérií SÚKL indikovat vyšetření amyloidovou PET na rozdíl od jasné klinické prezentace AN, která by spadala do kategorie „pravděpodobná AN“. Vyšetření biomarkerů podstoupili především pacienti s MCI s podezřením na neurodegenerativní etiologii obtíží a pacienti s lehkou demencí, u kterých AN byla možnou diagnózou, avšak klinická prezentace přispouštěla i jinou etiologii (pacienti s řečovou poruchou, behaviorálními symptomy či nálezem postischemických gliových změn na MR nejasného významu aj.). Všichni pacienti podstoupili klinické neurologické vyšetření, volumetrickou 1,5 T MR mozku, neuropsychologické vyšetření, amyloidovou PET s flutemetamolem a vyšetření biomarkerů v likvoru. Pacienti s odstupem mezi provedením amyloidové PET a vyšetřením likvoru větším než 24 měsíců byli ze studie vyřazeni.

Vyšetření likvoru

Vzorky odebraného likvoru byly zpracovány a archivovány při teplotě -80°C . Odběr, zpracování a archivace likvoru byly provedeny v souladu s evropskými doporučeními [23]. Hladiny A β 1-42, t-tau, p-tau v likvoru byly následně změřeny metodou ELISA za pomoci komerčních kitů od firmy Innogenetics (Gent, Belgie). Hraníční hodnoty pro pozitivitu AN byly na našem pracovišti na základě předchozích publikací a klinických zkušeností stanoveny takto: t-tau ≥ 358 pg/ml a p-tau ≥ 48 pg/ml [4]. U A β 1-42 jsme vycházeli jednak z konzervativnější hraníční hodnoty A β 1-42 ≤ 458 pg/ml [4] a také mírnější hraníční hodnoty A β 1-42 ≤ 665 pg/ml. Hraníční hodnoty t-tau, p-tau a konzervativnější A β 1-42 jsou obdobné jako hodnoty používané na jiných pracovištích v ČR [24] nebo hodnoty uváděné v recentní normativní studii [25]. Relativně nižší hraníční hodnoty A β 1-42 se sice ukazují jako poměrně specifické pro AN, mohou však vykazovat poměrně nízkou senzitivitu [24]. V klinické praxi je proto na našem pracovišti používána vyšší hodnota A β 1-42 ≤ 665 pg/ml, která vznikla konsenzuálně na základě zatím nepublikovaných interních ROC (receiver operating characteristic) analýz a lépe odráží klinickou diagnózu při longitudinálním sledování.

Za charakteristický pozitivní likvorový nález u pacientů s AN bylo považováno

Tab. 1. Charakteristika kohorty.

Charakteristika	
MMSE – průměr (SD)	24,65 (4,81)
období mezi amyloidovou PET a LP – medián (min–max); dny	350 (8–706)
věk při provedení PET – průměr (SD); roky	69,62 (8,99)
počet let vzdělání: průměr (SD); roky	14,60 (3,16)
pohlaví – procento mužů	45,60 %
amyloidová PET – procento pozitivních nálezů	55 %
A β 1-42 – medián (min–max); pg/ml	511,90 (106–2331)
p-tau: medián (min–max); pg/ml	56,6 (18–199)
t-tau: medián (min–max); pg/ml	457,46 (86,5–2258)

A β 1-42 – beta amyloid 1-42; LP – lumbální punkce; MMSE – Mini-Mental State Examination; p-tau – fosforylovaný tau protein 181; SD – směrodatná odchylka; t-tau – celkový tau protein

současné snížení A β 1-42 a zvýšení hladiny p-tau. Výsledky, kdy pro AN svědčil pouze jeden z těchto biomarkerů a druhý nikoliv, byly označeny jako nejednoznačné pro AN.

Amyloidová PET

Všechna vyšetření amyloidovou PET byla provedena v nemocnici Na Homolce na přístroji PET/CT (Biograph 40 TrueV HD od firmy Siemens [Mnichov, Německo]), jako radiofarmakum byla využita látka flutemetamol (Vizamyl od firmy GE Healthcare [Chicago, IL, USA]). Pro korekci atenuace byl iniciálně proveden nektrastní low-dose CT sken. Snímání aktivity probíhalo ve dvou fázích. První fáze snímání (časná – „perfuzní“) započala ihned po podání radiofarmaka (celkem 4×2 min pro korekci pohybu pacienta), druhá fáze (pozdní – „amyloidová“) proběhla za 90 min po podání radiofarmaka a trvala celkem 10 min. Snímky byly hodnoceny vizuálně pomocí metody GM-EDGE [18].

Statistická analýza dat

Pro statistické vyhodnocení jsme použili softwarový balík IBM SPSS verze 22 pro Windows (IBM, Armonk, NY, USA). Pro charakteristiku kohorty byly použity průměrné hodnoty věku, vzdělání, Mini-Mental State Examination (MMSE) a procentuální zastoupení pohlaví pacientů. Konkordance byla hodnocena jako diagnostická shoda uvnitř následujících skupin metabolických biomarkerů: amyloidová PET + A β 1-42, amyloidová PET + p-tau, amyloidová PET + t-tau, A β 1-42 + p-tau a amyloidová PET + A β 1-42 + p-tau. Následně byly porovnány hodnoty plochy pod křivkou (area

under the curve; AUC) jednotlivých ROC křivek pro A β 1-42, p-tau a poměr A β 1-42/p-tau vůči výsledku amyloidové PET. Optimální hraníční hodnota pro poměr A β 1-42/p-tau byla určena na základě nejvyššího Youdenova J indexu.

Výsledky

V kohortě 103 pacientů tvořily ženy 54 %. Průměrný věk pacientů byl 69,6 let, průměrná délka vzdělání 14,6 let a průměrný výsledek v testu Mini-Mental State Examination (MMSE) v době indikace amyloidové PET byl 24,7/30 bodů. Celkem 55 % pacientů bylo dle vyšetření PET A β pozitivních a 45 % A β negativních. Medián času mezi vyšetřením likvoru a provedením amyloidové PET byl 350 dní (tab. 1).

Konkordance mezi pozitivním výsledkem amyloidové PET a pozitivitou A β 1-42 v likvoru byla 79 %, mezi amyloidovou PET a pozitivitou p-tau 72 % a konkordance amyloidové PET a t-tau byla 66 %. Při porovnání výsledků pozitivit A β 1-42 a p-tau panovala shoda (nízká hladina A β a vysoká p-tau) v 60 %, což znamená, že 40 % výsledků likvoru bylo nejednoznačných pro AN. Diagnostická shoda mezi současnou pozitivitou amyloidové PET, A β 1-42 a p-tau byla 54 %. Konkordance mezi amyloidovou PET a A β 1-42 s hraníční hodnotou 458 pg/ml byla 69 %.

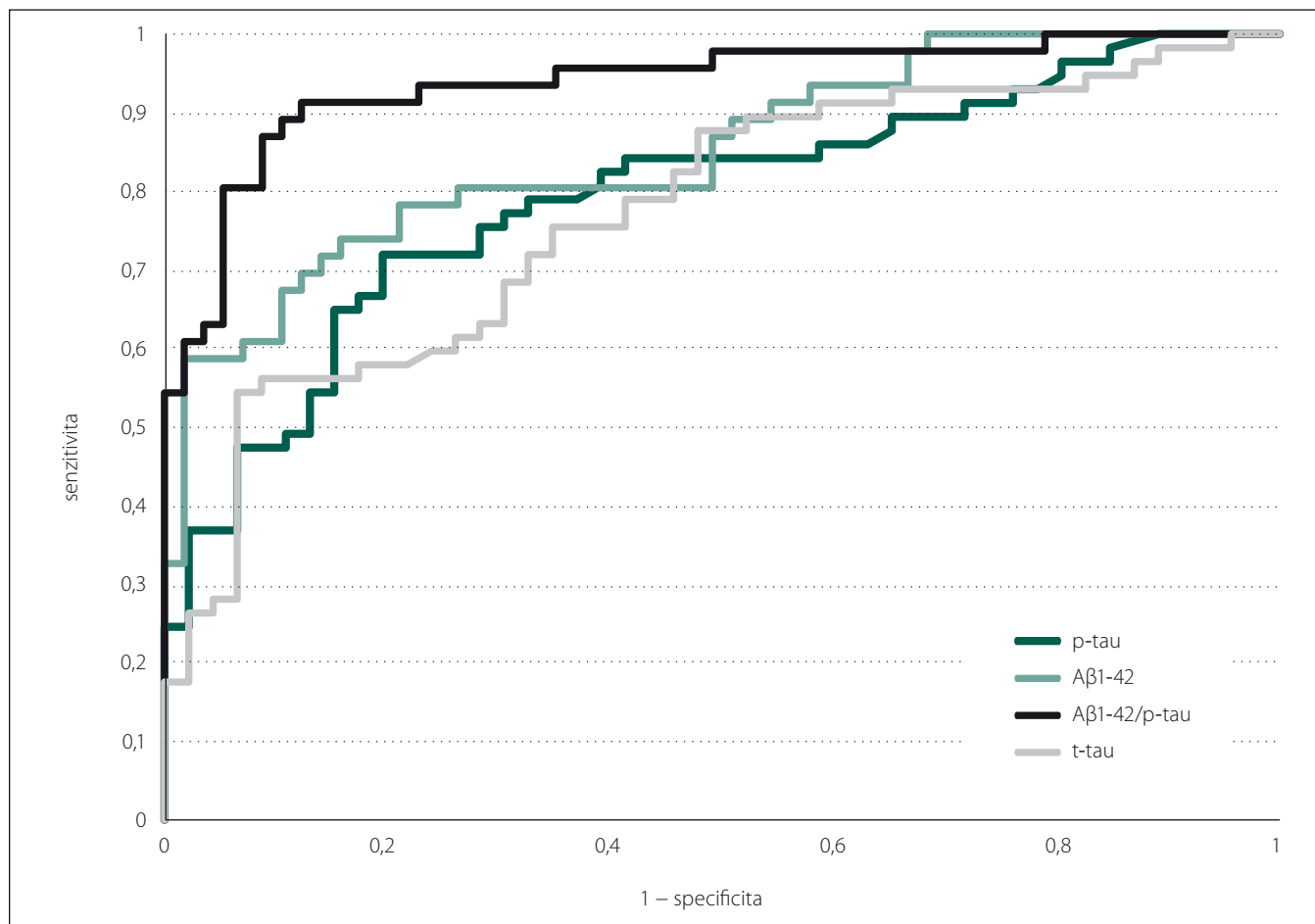
Mezi pacienty s pozitivní a negativní PET nejlépe rozlišoval poměr A β 1-42/p-tau (AUC = 0,938, 95% CI = 0,890–0,986; $p < 0,001$), následovaný samotným A β 1-42 (AUC = 0,852, 95% CI = 0,777–0,926; $p < 0,001$). Hodnoty p-tau (AUC = 0,793,

Tab. 2. Analýza křivky receiver operating characteristic.

V prvním řádku jsou uvedeny charakteristiky pro upravenou hraniční hodnotu Aβ 1-42 (665 pg/ml). Ve druhém řádku jsou uvedeny charakteristiky pro původní konzervativní hraniční hodnotu Aβ 1-42 (458 pg/ml). Ve třetím řádku jsou uvedeny charakteristiky pro hraniční hodnotu Aβ 1-42 s nejlepší senzitivitou a specifitou vůči amyloidové PET (614 pg/ml).

	AUC	Hraniční Hodnota	Youdenův J index	Senzitivita	Specifita
Aβ 1-42	0,852, 95% CI = 0,777–0,926; p < 0,001	665 pg/ml	0,525–0,547	65,2 %	89,5 %
Aβ 1-42	–	458 pg/ml	0,366–0,383	80,4 %	59,6 %
Aβ 1-42	–	614 pg/ml	0,581	73,9 %	84,2 %
p-tau	0,793, 95% CI = 0,707–0,880; p < 0,001	48 pg/ml	0,416–0,433	71,9 %	80,4 %
t-tau	0,774, 95% CI = 0,684–0,863; p < 0,001	358 pg/ml	0,335–0,353	61,4 %	73,9 %
Aβ 1-42/p-tau	0,938, 95% CI = 0,890–0,986; p < 0,001	9,47	0,790	91,3 %	87,3 %

Aβ 1-42 – beta amyloid 1-42; AUC – plocha pod křivkou; CI – interval spolehlivosti; p-tau – fosforylovaný tau protein; t-tau – celkový tau protein



Obr. 1. ROC křivka znázorňující predikci pozitivitu amyloidové PET podle hodnot biomarkerů v likvoru.

Aβ 1-42 – beta amyloid 1-42; p-tau – fosforylovaný tau protein; ROC – křivka receiver operating characteristic; t-tau – celkový tau protein

Fig. 1. ROC curve showing prediction of amyloid PET positivity according to the levels of cerebrospinal fluid biomarkers.

Aβ 1-42 – beta amyloid 1-42; p-tau – phosphorylated tau protein; ROC – receiver operating characteristic curve; t-tau – total tau protein

95% CI = 0,707–0,880; p < 0,001) a t-tau (AUC = 0,774, 95% CI = 0,684–0,863; p < 0,001) byly srovnatelné. Výsledky shr-

nují tab. 2 a obr. 1. Dle křivky ROC jsme stanovili v případě poměru Aβ 1-42/p-tau hraniční hodnotu 9,47 (J-index 0,790), při které

došlo s největší senzitivitou (91 %) a specifitou (91,3 %) k oddělení Aβ PET pozitivních a negativních pacientů (obr. 2).

Diskuze

V této studii byla analyzována konkordance výsledku amyloidové PET a metabolických biomarkerů v likvoru u pacientů s klinickou indikací k provedení amyloidové PET. Vzhledem k nastaveným indikačním kritériím SÚKL se jednalo převážně o pacienty v časných stádiích onemocnění a s atypickou prezentací onemocnění. Výsledky likvoru nebyly v řadě případů jednoznačné pro AN, nekorespondovaly s klinickou diagnózou, nebyly v době PET dostupné nebo byl likvor odebrán až po vyšetření PET.

Studie prokázala, že konkordance výsledku amyloidové PET s výsledky A β 1-42 a p-tau v likvoru u pacientů z Kognitivního centra Neurologické kliniky 2. LF UK a FN Motol (78 a 72 %) je srovnatelná s výsledky udávanými na zahraničních kohortách [20–22]. Snížená hladina A β 1-42 v likvoru je považována za senzitivní a specifický marker pro AN s nejvyšší konkordancí s amyloidovou PET, dále se pak za senzitivní a specifickou považuje zvýšená hladina p-tau, která však může být zvýšená i u jiných neurodegenerativních onemocnění. T-tau, který měl nejnižší konkordanci s amyloidovou PET (66 %), se z těchto tří likvorových biomarkerů považuje za nejméně specifický pro AN a jeho zvýšená hladina může být přítomna u jiných a nejen neurodegenerativních onemocnění CNS [26].

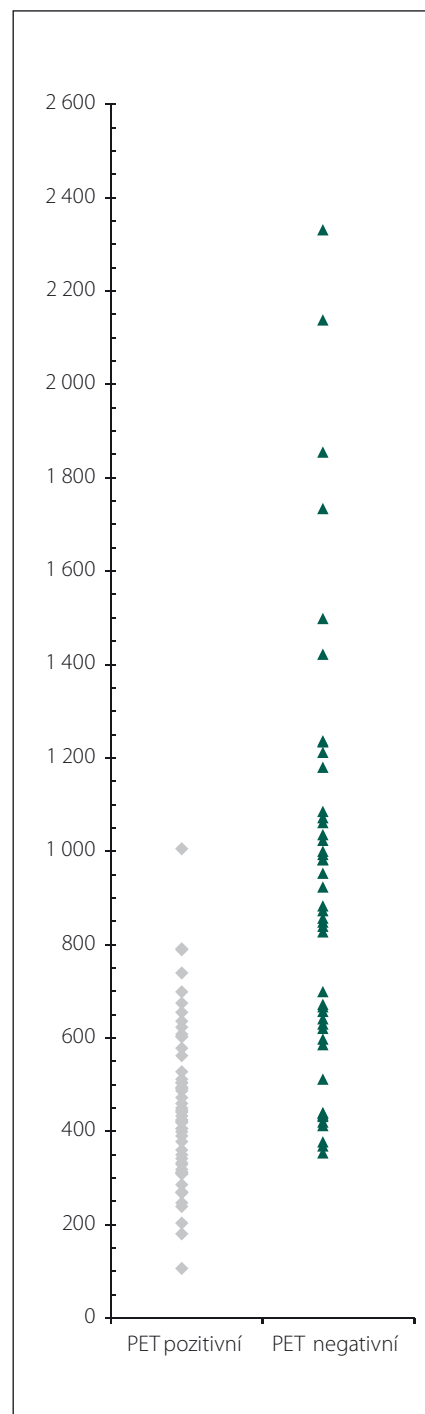
Ve 40 % případů jsme zaznamenali výsledek biomarkerů, který byl nejednoznačný pro AN (A β 1-42 byl normální a zároveň byl p-tau zvýšený anebo A β 1-42 snížený a zároveň p-tau normální). Diagnostická shoda napříč výsledky amyloidové PET, A β 1-42 a zároveň p-tau pak byla pozorována ještě u menšího procenta případů (54 %). Interpretovat výsledek vyšetření pouze na základě výsledku A β 1-42 může vzhledem ke známým preanalytickým obtížím vést k chybné diagnóze [27]. Odběr do různých typů zkumavek, odlišná denní doba odběru, různé laboratorní zpracování, časové prodlevy mezi náběrem a zpracováním a zamrazením vzorků jsou nejčastějšími faktory, které se na nekonzistentních výsledcích podílejí. Pro minimalizaci těchto preanalytických chyb je již několik let na našem pracovišti zaveden přesný protokol synchronizovaný s evropskými doporučeními pro odběr moku zahrnující použití atraumatické jehly, odběr v dopoledních hodinách, použití polypropylenových zkumavek, standardní centrifugaci, homogenizaci, rozpípetování do alikvotů a okamžité zamrazení na teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ [23,28].

Využití poměru A β 1-42/p-tau umožňuje jednoznačněji interpretovat výsledek nekonzistentního nálezu v likvoru a zvýšit diagnostickou shodu mezi výsledkem PET a likvoru. Na základě dostupných dat jsme jako hraniční hodnotu pro poměr A β 1-42/p-tau zvolili hodnotu $\leq 9,47$, která predikuje pozitivitu flutemetamolové amyloidové PET s 91,3% senzitivitou a 87,3% specificitou a odpovídá 90% celkové shodě (AUC = 0,938). Tento výsledek se velice blíží shodě mezi hodnotiteli (92 %) při vizuálním čtení snímků amyloidové PET s flutemetamolem metodou GM-EDGE, která byla v naší kohortě použita.

Výhodou analýzy biomarkerů likvoru je, že v preklinickém stadiu AN by dle současných modelů onemocnění měla být pozitivita A β v likvoru detekovatelná dříve než na amyloidové PET, ale v klinickém stadiu by již měla být obě vyšetření pozitivní [29]. Z likvoru lze rovněž na rozdíl od amyloidové PET kromě hodnoty A β 1-42 zjistit také hodnoty fosforylovaného a celkového tau proteinu. Naproti jeho nevýhodou může být, že se jedná se o invazivní vyšetření, které někdy vyžaduje krátkou hospitalizaci pacienta na neurologickém lůžku a u pacientů na trvalé antikoagulační terapii může být provedení tohoto vyšetření organizačně náročné a je nutno zvažovat klinický risk-benefit. Ačkoli incidence postpunkčních obtíží je u pacientů relativně nízká a pohybuje se v rádech jednotek procent [30,31], je dle našich zkušeností spolupráce (compliance) pacientů indikovaných k vyšetření biomarkerů v likvoru nižší než v případě pacientů indikovaných k provedení amyloidové PET, kde nejčastějším důvodem odmítnutí vyšetření byla radiofobie.

Výhodou amyloidové PET je dobrá standardizace a validita metody. Vizuálně čtené a binární (pozitivní/negativní) hodnocené snímky s flutemetamolem dosahují v porovnání s histopatologickou diagnózou vysoké senzitivity 88–92 %, i specificity 88–90 % [15–17] a shody mezi hodnotiteli až 92 % [18]. Snímky PET je možno hodnotit také automatizovanou metodou, která umožňuje kvantitativní popis výsledného obrazu (standardized uptake value ratio; SUVR) a která dle dostupných dat má dobrou shodu jak s histopatologickým nálezem, tak vizuálně hodnocenými snímky [17]. Využití automatizované metody však vyžaduje, aby stanovené hraniční hodnoty pro SUVR byly validovány v rámci pracoviště.

Vyšetření biomarkerů v likvoru metodou ELISA vykazuje dle dostupných dat dobrou shodu v rámci jednotlivých setů. Většina stu-



Obr. 2. Konkordance. Graf znázorňuje na ose y hodnoty A β 1-42 v likvoru podle skupin pacientů s pozitivním (PET pozitivní) a negativním (PET negativní) výsledkem amyloidové PET.

A β 1-42 – beta amyloid 1-42

Fig. 2. Concordance. Graph shows the values of A β 1-42 in cerebrospinal fluid on the y-axis according to patient groups with positive (PET positive) or negative (PET negative) amyloid PET results.

A β 1-42 – beta amyloid 1-42

díí se však shoduje na vysoké variabilitě mezi různými laboratořemi, která je pravděpodobně způsobena rozdíly v preanalytických a analytických metodách, např. používání rozdílných analytických kitů [12–14].

Důvodů, proč poměrná hodnota A β 1-42/p-tau zlepšuje senzitivitu a specifitu při predikci pozitivitu amyloidové PET, může být více. Jedním z nich je skutečnost, že většina nekonkordantních hodnot se nachází v „šedé zóně“ blízko hraničních hodnot, což potvrzují i data získaná v naší studii (obr. 1). Podobný jev popisovala i dříve zmiňovaná studie srovnávající konkordanci amyloidové PET s Pittsburskou substancí B a A β 1-42 [21]. Poměrná hodnota potom využije trendu ze „silnějšího“ z obou metabolitů. Za druhé tento poměr spojuje dvě metabolické cesty stejného patofyziologického procesu. I když dle hypotetického modelu nemoci je snížení hodnoty A β 1-42 v likvoru dřívějším markerem onemocnění než zvýšení hodnoty p-tau [29], v době, kdy pacient přichází s rozvinutými klinickými příznaky, by již měly být pozitivní oba markery. Třetím důvodem může být určitá normalizace hodnot A β 1-42 vůči p-tau, která snižuje vliv fluktuací a variací v produkci a sekreci A β 1-42 do likvoru [32].

Za pozitivní zjištění považujeme, že výsledky konkordance jsou srovnatelné s výše citovanou studií BioFINDER se stejným radiofarmakem, která jednak zahrnovala více subjektů (celkem 277 pacientů), jednak využila novější metodu ECLIA ke stanovení hladin metabolických biomarkerů v likvoru oproti metodě ELISA použité v naší kohortě [22]. Poměr A β 1-42/p-tau (resp. poměr p-tau/A β 1-42) ve studii BioFINDER dosahoval celkové diagnostické shody v 85,7–93,2 % (AUC 0,91–0,97). Naše kohorta zahrnovala více atypických případů, neboť se jednalo o pacienty s MCI či lehkou demencí klasifikovanou jako „možnou AN“ dle kritérií NIA-AA splňující PET indikační kritéria SÚKL, narozdíl od studie BioFINDER, která se orientovala spíše na časná stadia (pacienti s SCD a MCI).

V naší práci byly použity upravené hraniční hodnoty pro A β 1-42 a také konzervativnější hodnoty, které původně vycházely z metody validované na pacientech s demencí při AN [4]. Porovnáním s výsledkem amyloidové PET se ukázalo, že na základě analýzy Youdenova J indexu máme upravené hodnoty v této kohortě pacientů lépe vystihovaly přítomnost amyloidové patologie na PET než původně navržená norma. Youdenův J index u A β 1-42 pro původní konzerva-

tivní hodnotu ≤ 458 pg/ml byl mezi hodnotami 0,366–0,383, zatímco u novější hraniční hodnoty 665 pg/ml byl mezi hodnotami 0,525–0,547. Negativní a pozitivní pacienty dle amyloidové PET nejlépe oddělovala hodnota 614 pg/ml, jejíž J index byl 0,581 (tab. 2).

Na základě informací z předchozích obdobných studií [20] byly ze studie vyřazeni pacienti, u nichž odstup mezi amyloidovou PET a vyšetřením likvoru byl více než 24 měsíců. Následná post hoc analýza také ukázala, že časový interval mezi amyloidovou PET a vyšetřením likvoru se nelišil mezi pacienty s konkordantními a nekonkordantními výsledky (amyloidová PET + A β 1-42, amyloidová PET + p-tau a amyloidová PET + t-tau).

Za největší limitaci této studie považujeme skutečnost, že ačkoli je zde vizuálně hodnocená amyloidová PET brána za nejbližší skutečnému histopatologickému obrazu, nebylo možné určit definitivní diagnózu pomocí pitvy a histologických nálezů. Cílem práce však bylo zmapovat konkordanci nejpoužívanějších biomarkerů a navrhnout způsoby interpretace nejednoznačných výsledků biomarkerů z likvoru tak, aby konkordance byla co nejvyšší. Dále je nutno zdůraznit, že depozita kortikálního fibrilárního amyloidu, která je možno zobrazit metodami PET, nejsou totožná s rozpustným A β 1-42 v likvoru, ačkoli odrážejí stejný patofyziologický proces. V dalších studiích by také bylo vhodné porovnat poměr A β 1-42 a A β 1-40, ke kterému jsme v naší studii neměli přístup.

Z klinického pohledu nadále zůstává otevřena otázka možnosti smíšených patologií, které nejsou z neuropatologického pohledu nijak vzácným nálezem [33]. Symptomatictí pacienti s pozitivním výsledkem amyloidové PET mohou být primárně postiženi jinou patologií (např. frontotemporální lobární degenerací) a zároveň AN v preklinickém stadiu. Interpretace výsledku amyloidové PET je proto jednoznačnější u pacienta s negativním výsledkem než u pacienta s výsledkem pozitivním. Dále je nutno zdůraznit, že ačkoli dle klasifikace ATN (navrhované jako výzkumný rámec) znamená pozitivita biomarkerů přítomnost Alzheimerovské patologie (A+) nebo Alzheimerovy nemoci (A+T+), z klinického pohledu pacienty pouze na základě výsledků biomarkerů zatím takto diagnostikovat nelze a při interpretaci je nutno přihlížet i ke klinické prezentaci a kontextu [34].

Závěr

Závěrem lze shrnout, že amyloidová PET s flutemetamolem i analýza A β 1-42 a p-tau

v likvoru představují perspektivní metody, které umožňují přesnější a časnější diagnostiku AN. Každá z těchto metod má své limitace a přednosti využitelné v různých klinických situacích, avšak z diagnostického pohledu vykazují obě metody dobrou vzájemnou shodu, nejsou však jednoduše zaměnitelné. V případě nejednoznačných nálezů v likvoru doporučujeme využít poměrné hodnoty A β 1-42 a p-tau, která celkovou diagnostickou shodu biomarkerů likvoru a amyloidové PET významně zvyšuje.

Etické aspekty

Práce byla schválena etickou komisí FN Motol (č. EK-701/16, dne 25. 5. 2016), Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Grantová podpora

Práce byla podpořena granty: IPE 6012, AZV 16-27611A, MZ ČR – RVO, FN v Motole 0006420. Podpořeno také z Evropského fondu pro regionální rozvoj – projekt ENOCH (reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868).

Konflikt zájmů

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádný konflikt zájmů.

Poděkování

Doc. MUDr. Otakar Bělohávek, CSc., MUDr. Monika Jarůšková, MUDr. Ondřej Lerch, MUDr. Ivana Mokrišová, MUDr. Martina Pařízková, Mgr. Hana Marková, Mgr. Adéla Fendrych Mazancová, Mgr. Kateřina Čechová, Mgr. Veronika Matušková, Vladislava Fulínová a dále všichni laboratorní a radiologičtí asistenti, kteří pomáhali s vyšetřením pacientů.

Literatura

- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7(3): 263–269. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
- Albert MS, Dekosky ST, Dickson D et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7(3): 270–279. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.008.
- Ressner P, Hort J, Rusina R. Doporučené postupy pro diagnostiku Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Cesk Slov Neurol N* 2008; 71/104(4): 494–501.
- Hort J, Glosová L, Vyhnanek M et al. Tau protein a beta amyloid v likvoru u Alzheimerovy choroby. *Cesk Slov Neurol N* 2007; 70/103(1): 30–36.
- Nelson PT, Dickson DW, Trojanowski JQ et al. Limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy (LATE): consensus working group report. *Brain* 2019; 142(6): 1503–1527. doi: 10.1093/brain/awz099.
- Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol* 2013; 12(2): 207–216. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70291-0.
- Jack CR, Bennett DA, Blennow K et al. NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's

- disease. *Alzheimers Dement* 2018; 14(4): 535–562. doi: 10.1016/j.jalz.2018.02.018.
- 8.** Beach TG, Monsell SE, Phillips LE et al. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005–2010. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; 71(4): 266–273. doi: 10.1097/NEN.0b013e31824b211b.
- 9.** Salloway S, Sperling R, Fox NC et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2014; 370(4): 322–333. doi: 10.1056/NEJMoa1304839.
- 10.** Degenhardt EK, Witte MM, Case MG et al. Florbeta-pir F18 PET amyloid neuroimaging and characteristics in patients with mild and moderate Alzheimer dementia. *Psychosomatics* 2016; 57(2): 208–216. doi: 10.1016/j.psym.2015.12.002.
- 11.** SÚKL. Opatření obecné povahy. [online]. Dostupné z URL: http://www.sukl.cz/file/88095_1_1.
- 12.** Vos SJB, Visser PJ, Verhey F et al. Variability of CSF Alzheimer's disease biomarkers: implications for clinical practice. *PLoS One* 2014; 9(6): e100784. doi: 10.1371/journal.pone.0100784.
- 13.** Mattsson N, Andreasson U, Persson S et al. The Alzheimer's Association external quality control program for cerebrospinal fluid biomarkers. *Alzheimers Dement* 2011; 7(4): 386–395. doi: 10.1016/j.jalz.2011.05.2243.
- 14.** Verwey NA, van der Flier WM, Blennow K et al. A worldwide multicentre comparison of assays for cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease. *Ann Clin Biochem* 2009; 46(Pt 3): 235–240. doi: 10.1258/acb.2009.008232.
- 15.** Salloway S, Gamez JE, Singh U et al. Performance of [18F] flutemetamol amyloid imaging against the neuritic plaque component of CERAD and the current (2012) NIA-AA recommendations for the neuropathologic diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst.)* 2017; 9: 25–34. doi: 10.1016/j.dadm.2017.06.001.
- 16.** Curtis C, Gamez JE, Singh U et al. Phase 3 trial of flutemetamol labeled with radioactive fluorine 18 imaging and neuritic plaque density. *JAMA Neurol* 2015; 72(3): 287–294. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.4144.
- 17.** Thurfjell L, Lilja J, Lundqvist R et al. Automated quantification of 18F-flutemetamol PET activity for categorizing scans as negative or positive for brain amyloid: concordance with visual image reads. *J Nucl Med* 2014; 55(10): 1623–1628. doi: 10.2967/jnumed.114.142109.
- 18.** Belohlavek O, Jaruskova M, Skopalova M et al. Improved beta-amyloid PET reproducibility using two-phase acquisition and grey matter delineation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2019; 46(2): 297–303. doi: 10.1007/s00259-018-4140-y.
- 19.** Blennow K, Mattsson N, Schöll M et al. Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 2015; 36(5): 297–309. doi: 10.1016/j.tips.2015.03.002.
- 20.** Leuzy A, Carter SF, Chiotis K et al. Concordance and diagnostic accuracy of [11C]PIB PET and cerebrospinal fluid biomarkers in a sample of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2015; 45(4): 1077–1088. doi: 10.3233/JAD-142952.
- 21.** Zwan MD, van Harten A, Ossenkoppele R et al. Concordance between cerebrospinal fluid biomarkers and [11C]PIB PET in a memory clinic cohort. *J Alzheimers Dis* 2014; 41(3): 801–807. doi: 10.3233/JAD-132561.
- 22.** Hansson O, Seibyl J, Stomrud E et al. CSF biomarkers of Alzheimer's disease concord with amyloid- β PET and predict clinical progression: a study of fully automated immunoassays in BioFINDER and ADNI cohorts. *Alzheimers Dement* 2018; 14(11): 1470–1481. doi: 10.1016/j.jalz.2018.01.010.
- 23.** Vanderstichele H, Bibl M, Engelborghs S et al. Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement* 2012; 8(1): 65–73. doi: 10.1016/j.jalz.2011.07.004.
- 24.** Bartoš A, Čechová L, Švarcová J et al. Likvorový tripleť (tau proteiny a beta-amyloid) v diagnostice Alzheimerovy-Fischerovy nemoci. *Cesk Slov Neurol N* 2012; 75/108(5): 587–594.
- 25.** Bartoš A, Smětáková M, Nosková L et al. Možnosti stanovení likvorového tripletu tau proteinů a β -amyloidu 42 metodami ELISA a orientační normativní vodítka *Cesk Slov Neurol N* 2019; 82/115(5): 533–540. doi: 10.14735/amcsnn2019533.
- 26.** Blennow K. A review of fluid biomarkers for Alzheimer's disease: moving from CSF to blood. *Neurol Ther* 2017; 6 (Suppl 1): 15–24. doi: 10.1007/s40120-017-0073-9.
- 27.** Schauer SP, Mylott WR, Yuan M et al. Preanalytical approaches to improve recovery of amyloid- β peptides from CSF as measured by immunological or mass spectrometry-based assays. *Alzheimers Res Ther* 2018; 10(1): 118. doi: 10.1186/s13195-018-0445-0.
- 28.** Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology* 2009; 73(22): 1914–1922. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c47cc2.
- 29.** Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 2010; 9(1): 119–128. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70299-6.
- 30.** Blennow K, Wallin A, Häger O. Low frequency of post-lumbar puncture headache in demented patients. *Acta Neurol Scand* 1993; 88(3): 221–223. doi: 10.1111/j.1600-0404.1993.tb04221.x.
- 31.** Duits FH, Martinez-Lage P, Paquet C et al. Performance and complications of lumbar puncture in memory clinics: results of the multicenter lumbar puncture feasibility study. *Alzheimers Dement* 2016; 12(2): 154–163. doi: 10.1016/j.jalz.2015.08.003.
- 32.** Lucey BP, Fagan AM, Holtzman DM et al. Diurnal oscillation of CSF A β and other AD biomarkers. *Mol Neurodegener* 2017; 12(1): 36. doi: 10.1186/s13024-017-0161-4.
- 33.** Woodward M, MacKenzie IR, Hsiung GY et al. Multiple brain pathologies in dementia are common. *Eur Geriatr Med* 2010; 1(5): 259–265. doi: 10.1016/j.eurger.2010.07.012.
- 34.** Kalvach P, Kupka K, Vogner M. Je amyloid podstatný pro senilní demenci? *Cesk Slov Neurol N* 2018; 81/114(2): 164–170. doi: 10.14735/amcsnn2018csnn.eu1.

Erratum

U článku Hybášková J, Jar O, Novák V et al „Možné využití spánkové endoskopie pro zvýšení efektivity léčby (operační i neoperační) u pacientů s obstrukční spánkovou apnoí“ byla dodatečně doplněna grantová podpora.

Podpořeno MZ ČR RVO FNOs/2016.