**Protokol studie**

1. **Název studie:**

**Virtuální realita ve fyzioterapii nemocných s roztroušenou sklerózou – cesta k zefektivnění plastických a adaptačních procesů mozku**

1. **Hlavní řešitel studie:**

Doc. PhDr. Kamila Řasová, Ph.D.:

Klinika revmatologie a rehabilitace 3. LF UK a FTN, Vídeňská 800, 140 59 Praha 4 – Krč

Email: kamila.rasova@lf3.cuni.cz

Telefon: 604511416

**Spoluřešitelé:**

Doc. Ing. Jaroslav Tintěra, CSc., Pracoviště radiodiagnostiky a intervenční radiologie, IKEM

Prof. MUDr. Ivana Štětkářová, CSc., MHA, Neurologická klinika 3. LF UK a FNKV v Praze

Doc. Ing. Libor Váša, Ph.D., Fakulta aplikovaných věd Západočeské univerzity v Plzni

prof. MUDr. Marie Černá, DrSc., [Ústav lékařské genetiky 3. LF UK](https://is.cuni.cz/webapps/whois2/org/1992692036453942/?lang=cs)

**Koordinátor:**

MUDr. Barbora Miznerová, Klinika revmatologie a rehabilitace 3. LF UK a FTN, Vídeňská 800, 140 59 Praha 4 – Krč

1. **Popis studie:**

U 60–75% lidí s roztroušenou sklerózou (RS) je popisována porucha funkce horních končetin (například snížená unilaterální nebo bilaterální zručnost, manuální neobratnost, poruchy senzitivity, třes), které negativně ovlivňují schopnosti vykonávat aktivity denního života (1, 2). Fyzioterapie hraje v léčbě poruch hybnosti horních končetin zásadní roli. Přístupy k řešení obtíží se však liší (posilování, trénink vytrvalosti, senzorický trénink, constraint induced movement therapy, roboterapie, atd.) (3). Ze současného výzkumu jednoznačně nevyplývá, která metoda je, na jaké poruchy, účinnější. Jednou z možností, jak zvýšit účinnost terapie je využití virtuální reality, inovativního technologického konceptu, který využívá herních mechanismů (systém výzvy a odměny), což umožňuje vyšší koncentraci a motivaci k plnění úkolů. Ze současného výzkumu vyplývá, že virtuální realita je bezpečnou a efektivní metodou pro rehabilitaci chůze a rovnováhy (4, 5), ale i pro zlepšení funkce horních končetin (6). Náš pilotní projekt (7) ukázal, že virtuální realita bez zpětné vazby fyzioterapeuta není v porovnání se standardní fyzioterapií účinnější. Ve spolupráci s Katedrou informatiky a výpočetní techniky Fakulty aplikovaných věd v Plzni jsme vyvinuli nový terapeutický přístup, který využívá virtuální prostředí spontánně motivující pacienta k realizaci pohybu. Zároveň ho navádí, jak má pohyb provést. Jeho kvalitní provedení zajišťuje terapeut technikami neuroproprioceptivní facilitace a inhibice (proprioceptivní neuromuskulární stabilizace a motorické programy aktivující terapie). Předpokládáme, že tento přístup zlepší funkčnost horní končetiny a koordinaci trupového svalstva, zkvalitní vykonávání aktivit běžného života a zlepší kvalitu života lidí s RS. V porovnání s identickou terapií zaměřenou na obnovu funkce horních končetin, ale bez virtuálního prostředí, bude efektivnější. Předpokládá se zvýšení terapeutického efektu terapie využívající virtuálního prostředí (VR) oproti standardní fyzioterapii v důsledku multifaktoriální stimulace smyslů a dopaminových center v mozku (8), a díky aktivaci zrcadlových neuronů.

Virtuální realita tak má velký potenciál zefektivnit plastické a adaptační procesy, které fyzioterapii provázejí. U nemoc­ných s RS byly popsány kompenzační mechanismy CNS na úrovni axonální, neuronální, synaptické i systémové reorganizace (především remyelinizace a funkční reorganizace), pozorované a dokumentované pomocí vyšetření **funkční magnetickou rezonancí**. Adaptivní mozková plasticita u RS nabízí základ pro funkční reorganizaci díky lokálnímu „remapování“ kortikální reprezentace, zvýšenou aktivaci funkčně nadřazených oblastí a posunutí interhemisferální lateralizace směrem k ipsilaterární hemisféře (9, 10). V předchozím výzkumu (9, 11–13) jsme dokumentovali, že neuroproprioceptivní „facilitace a inhibice“ vede k plastickým a adaptačním změnám mozku. Přepokládáme, že využití virtuální reality tyto změny zesílí a zefektivní.

Zajímají nás také **neurofyziologické mechanismy účinku rehabilitace**, které budeme sledovatpomocí dlouhých nekódujících RNA (lncRNA), které se podílejí na důležitých buněčných regulacích, včetně regulace genomového imprintingu, epigenetické modifikace chromatinu, transkripční interference a exportu z jádra. Bylo publikováno mnoho studií zabývající se molekulární rolí lncRNA v patogenezi RS a jejich potenciální aplikací jako diagnostických a prognostických biomarkerů. Zejména se jedná o studie identifikující lncRNA jako možné biomarkery vzniku nemoci, jejího stupně aktivity, fáze progrese a odpovědi na léčbu (14). Např. bylo zdokumentováno, že lncRNA GAS5 inhibuje mikrogliální M2 polarizaci a zhoršuje demyelinizaci (15). Bylo i popsáno, že lncRNA působí jako inhibující konkurenční endogenní RNA (16). Jiné studie analyzovaly jednonukleotidový polymorfismus lncRNA, který ovlivňuje strukturu i funkci molekul. Alelová varianta lncRNA TRPM2-AS, zapojené do oxidativního stresu a autofagie, byla asociována s horší prognózou RS (17). Alelové varianty a s nimi korespondující změny genové exprese lncRNA GAS5 a mikroRNA miR-137 byly nalezeny jako genetické markery predispozice k RS (18). Vzhledem k mnohočetnému ovlivnění patogeneze choroby se lncRNA zdají být vhodným novým molekulárním prostředkem terapie RS. Souhrnem, zkoumání lncRNA zapojených do procesů genové regulace může pomoci porozumět neurofyziologickým účinkům rehabilitace nemocných s RS.

Vzhledem k tomu, že RS patří mezi orgánově specifické autoimunitní choroby, chceme rovněž sledovat stav imunitního systému na základě stanovení funkčního stavu dendritických buněk, u kterých bylo prokázáno, že migrují do CNS a hrají kritickou roli v patogenezi RS (19). Navíc se u tolerogenních dendritických buněk zvažuje jejich využití v antigen-specifické terapii (20).

**Organizace studie**

Jedná se o randomizovanou studii, která probíhá na Klinice revmatologie a rehabilitace 3. LF UK a FTN a Neurologické klinice 3. LF UK a FNKV v Praze. Virtuální prostředí je vyvíjeno ve spolupráci s Fakultou aplikovaných věd Západočeské univerzity v Plzni, zobrazení adaptačních procesů mozku na Pracovišti radiodiagnostiky a intervenční radiologie, IKEM.

Ve studii budou porovnávány dvě skupiny, které podstoupí ambulantní fyzioterapii na neurofyziologickém podkladě (2x týdně, 15 terapií, cca 60 minut) zaměřenou na zlepšení funkce horních končetin, stability trupu, zvedání se ze sedu do stoje a stability stoje. Experimentální skupina program absolvuje s využitím virtuálního prostředí, zatímco kontrolní skupina standardně bez virtuálního prostředí. Účastníci studie budou vyšetřeni dvakrát: před začátkem a na konci terapeutického programu.

Předpokládáme, že neuroproprioceptivní „facilitace, inhibice“, tzv. fyzioterapie na neurofyziologickém podkladě využívající speciálně naprogramované virtuální prostředí, bude mít vyšší efekt na funkci horních končetin, stabilitu trupu, nácvik a rychlost vstávání, a kvalitu života lidí s roztroušenou sklerózou mozkomíšní než stejná terapie prováděná v reálném prostředí.

Dále předpokládáme, že fyzioterapie povede ke změnám funkční aktivity a funkční konektivity mozku. Virtuálním prostředí pak tyto adaptační změny zesílí/zefektivní. Efekt rehabilitace bude monitorován pomocí molekulárně biologických ukazatelů (lncRNA) a ukazatelů autoimunitní aktivity (funkční stav dendritických buněk).

**Účastníci studie**

Kritéria pro zahrnutí do studie:

* jednoznačná klinická diagnóza RS
* EDSS ≥ 2 a ≤ 7 určena neurologem nebo vyškoleným klinikem
* bez recidivy poslední měsíc
* bez změn v nemoci modifikující léčby a bez terapie kortikoidy v průběhu posledního měsíce

Vylučující kritéria:

* jiné faktory narušující mobilitu horních končetin (st. po mozkové příhodě, zlomeniny, muskuloskeletální příčiny)
* snížení kognitivní funkce komplikující vyšetření a následnou terapii
* závažná interní kontraindikace
* kontraindikace vyšetření pomocí fMRI (implantován kardiostimulátor, přítomnost kovových svorek či jiných kovových předmětů v oblasti hlavy a obličeje)

**Vyšetření**

***Základní údaje***

Ve studii budou zaznamenávány osobní informace: pohlaví, věk, výška, váha, dominance končetin; a informace o onemocnění: délka trvání od diagnózy, typ RS, Expanded Disability Status Scale (EDSS, škála kvantifikující postižení nervového systému u pacientů s RS, informace od neurologa, ne starší 3 měsíců), doba od posledního relapsu RS a doba od poslední hospitalizace, současná farmakologická léčba, údaje o poslední léčbě kortikosteroidy, doba od poslední rehabilitace, údaje o četnosti pádů a kompenzačních pomůckách.

***Klinické vyšetření***

Vyšetření bude trvat přibližně 1-1,5 hodiny. Vyšetřující bude věnovat pozornost pacientově celkové kondici a v případě potřeby dobu vyšetření přizpůsobí.

Pro klinické vyšetření budou použity tyto validizované testy:

* 5STS - Five times Sit to Stand test *(Test pěti vstání) – hodnocení posazování*
* 9HPT - Nine Hole Peg Test *(Devítikolíkový test)*

*– hodnocení jemné manuální zručnosti*

* HGS - Hand Grip Strength *(Síla stisku ruky) – hodnocení dynamometrem*
* BNB - Box and Block Test *(Kostičkový test) – hodnocení hrubé manuální zručnosti*
* Akcelerometr *LIS 3LV02DQ (od firmy ST Micro)*

*– vyšetření třesu (frekvence, rytmicita, atd.)*

A dotazníky:

* MSIS-29 Multiple Sclerosis Impact Scale - 29 (Škála dopadu RS – 29)

 – dotazy na vnímání dopadu onemocnění

* EQ-5D-3L-health questionnare (Evropský dotazník zdraví - 5 rozměrů - 5 úrovní)

– dotazy týkající se mobility, sebeobsluhy, bolesti, denních činností

* VAS - škála hodnotící subjektivní vnímání schopností jemné motoriky a stability sedu

Po ukončení programu budou navíc vyplněny tyto dotazníky:

* Dotazník týkající se virtuální reality (pouze účastníci experimentální skupiny)
* Dotazník celkového pocitu změny

***Vyšetření funkční magnetické rezonance (fMRI)***

Účelem fMRI bude sledovat změny funkční a morfologické konektivity. Vyšetření pomocí fMRI proběhne v návaznosti na vstupní a výstupní vyšetření. Vyšetření budou prováděna na systému MR Vida 3T v IKEM, pomocí hlavové RF cívky s 64 přijímacími kanály. Mimo základní strukturální zobrazení (sekvence 3D SPACE FLAIR s izotropním prostorovým rozlišením 1 mm3) obsahuje vyšetřovací protokol měření funkční konektivity pomocí klidové fMRI (Resting state fMRI) a měření strukturální konektivity pomocí MR zobrazení anizotropie molekulární difuze (zobecněné DTI, měření 108 směrů, 3 různými b-faktory, aby bylo možno hodnotit nejen frakční anizotropii, ale také parametr kurtuosity). Dle vyšetřovacího protokolu bude klidové měření následováno unilaterální aktivní stimulací a to celkem čtyřikrát pro každou končetinu. Celé vyšetření MR nepřesáhne 30 minut.

***Monitorování molekulárně biologických ukazatelů rehabilitace***

Pro analýzu RNA a dendritických buněk bude odebrána nesražená plná krev na lačno. Odběr bude proveden při vstupním a výstupním vyšetření.

Pro izolaci vysoce kvalitní RNA přímo z plné krve bude použit A RiboPure™-Blood Kit (cat# AM1928, ThermoFisher Scientific). Tento kit obsahuje RNAlater® Solution (cat.# AM7020, ThermoFisher Scientific), který chrání RNA a je navržen tak, aby umožnil pozdější zpracování vzorků (nikoliv hned po odběru vzorků), což je procesně lépe realizovatelné. RNAlater® Solution také zablokuje daný profil genové exprese buněk. Takto ošetřené vzorky mohou být bezpečně skladovány při pokojové teplotě po delší časová období (až tři dny i více). Krevní vzorky skladované v RNAlater® Solution dosahují kvality RNA srovnatelné s kvalitou vzorků, zpracovaných okamžitě dle komerčních webových stránek. Očekávané průměrné výtěžky celkové RNA budou asi 2–4 µg/0.5 ml plné krve. Celková RNA bude reverzní transkriptázou přepsána do cDNA. Aby se předešlo chybě, bude exprese lidské lncRNA a interního endogenního genu (např. GAPDH) kvantifikována pomocí RNA získané ze zaslepených vzorků (to znamená utajení alokace původu vzorku).

Dendritické buňky budou získány z krevních monocytů, aktivovány obecnými antigeny (liposacharidem) a bude měřena jejich antigen-prezentující a stimulující schopnost.

**Terapie**

Ambulantní fyzioterapie na neurofyziologickém podkladě (2x týdně, 15 terapií, cca 60 minut) zaměřená na funkci horní končetiny, stabilitu trupu a nácviku vstávání, která využívá virtuálního prostředí.

***Kontrolní skupina***

V terapii budou kombinovány principy dvou fyzioterapeutických metod na neurofyziologickém podkladě (Proprioceptivní neuromuskulární facilitace, PNF, a Motorické programy aktivující terapie, MPAT), které se u roztroušené sklerózy standardně používají a jejichž efektivita již byla prokázána.

MPAT navozuje dílčí motorické funkce, které uzrávají v průběhu posturálního vývoje. Tyto programy jsou vybavovány pouze na podvědomé úrovni. Dochází k vyvolání a podpoře posturální stabilizace, zvyšuje se stabilizační funkce vsedě, při vstávání, stoji a nákroku. Dochází k aktivaci celého těla, k souhře mezi posturálním systémem, vzpřimovacím systémem a systémem fázických pohybů. PNF slouží k naučení daného pohybu a následně pohybového vzorce na základě kooperace alfa-motoneuronů a proprioreceptorů obsažených ve svalech, šlachách a kloubních pouzdrech. Díky opakování pohybu umožňuje opět nalézt vhodné efektivní pohybové vzorce s co možná nejvyšší biomechanickou efektivitou. Pohyb je vedený po diagonálách a aktivuje končetinu od akra až po kořenové klouby a trup.

***Experimentální skupina***

Účastníci podstoupí stejnou fyzioterapii na neurofyziologickém podkladě (kombinace MPAT a PNF), avšak ve virtuálním prostředí.

Pro virtuální realitu bude použit HTC Vive simulující určité prostředí promítané brýlemi v různých posturálních pozicích aktivovaných pomocí MPAT. Senzory umístěné na horní končetině a trupu sledují správnost provedení daného pohybového vzorce dle PNF a poskytnou pacientovi následnou zpětnou vazbu. Virtuální prostředí zvyšuje motivaci lidí aktivně se zapojit do terapie, usnadňuje porozumění toho, jak požadovaný pohyb vykonat. Vytvářený vizuální a sluchový prožitek virtuální reality umocňuje efekt terapie. Dochází ke zvýšení koncentrace, utlumení rušivých elementů okolí a k multisenzorické stimulaci. To vše usnadní učení efektivního pohybového vzorce a jeho následné zafixování s cílem zlepšit běžné denní činnosti.

***Reference***

1. Johansson S, Ytterberg C, Claesson IM, Lindberg J, Hillert J, Andersson M, et al. High concurrent presence of disability in multiple sclerosis. Associations with perceived health. Journal of Neurology. 2007;254(6):767-73.

2. Bertoni R, Lamers I, Chen CC, Feys P, Cattaneo D. Unilateral and bilateral upper limb dysfunction at body functions, activity and participation levels in people with multiple sclerosis. Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England). 2015;21(12):1566-74.

3. Baert I FP. Prevalence and assessment of the upper limb function in multiple sclerosis. In: K. Ř, editor. Neurorehabilitation of people with impaired mobility - therapeutic interventions and assessment tools. Prague: 3rd Medical Faculty, Charles University; 2017.

4. Streicher M.C. AJL, Sutliff M.H., Bethoux F. Effects and feasibility of virtual reality system vs traditional physical therapy training in multiple sclerosis patients. International Journal of Therapy and Rehabilitation. 2018;25(10).

5. Massetti T, Trevizan IL, Arab C, Favero FM, Ribeiro-Papa DC, de Mello Monteiro CB. Virtual reality in multiple sclerosis - A systematic review. Mult Scler Relat Disord. 2016;8:107-12.

6. Jonsdottir J, Perini G, Ascolese A, Bowman T, Montesano A, Lawo M, et al. Unilateral arm rehabilitation for persons with multiple sclerosis using serious games in a virtual reality approach: Bilateral treatment effect? Mult Scler Relat Disord. 2019;35:76-82.

7. Daubner J. HB, Sviatková Z., Řasová K. . Vliv fyzioterapeutických facilitačních technik a virtuální reality na funkci horní končetiny u pacientů s roztroušenou sklerózou. Studentská vědecká konference 3 lékařské fakulty Univerzity Karlovy: Trimed – spolek studentů 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy; 2018.

8. Janssen J, Verschuren O, Renger WJ, Ermers J, Ketelaar M, van Ee R. Gamification in Physical Therapy: More Than Using Games. Pediatric physical therapy : the official publication of the Section on Pediatrics of the American Physical Therapy Association. 2017;29(1):95-9.

9. Prochazkova M, Tintera J, Spanhelova S, Prokopiusova T, Rydlo J, Pavlikova M, Prochazka A, Rasova K. Brain activity changes following neuroproprioceptive "facilitation, inhibition" physiotherapy in multiple sclerosis: a parallel group randomized comparison of two approaches. Eur J Phys Rehabil Med. 2020 Sep 16. doi: 10.23736/S1973-9087.20.06336-4. Epub ahead of print. PMID: 32935954.

10. TOMASSINI, V. et al. Neuroplasticity and functional recovery in multiple sclerosis. Nat Rev Neurol. 2012b, 8(11), 635-646. ISSN 1759-4758.

11. Rasova, K., et al. (2014). "Motor programme activating therapy influences adaptive brain functions in multiple sclerosis: clinical and MRI study." [Int J Rehabil Res.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25325167) 2015;38(1):49-54.

12. Ibrahim I., Tintera J. Skoch A., Jirů F., Hlustik P., Martinkova P., Zvara K., Rasova K. Fractional anisotropy and mean diffusivity in the corpus callosum of patients with multiple sclerosis: the effect of physiotherapy. Neuroradiology 2011;53(11):917-926.

13. Řasová K, Krásenský J, Havrdová E, Obenberger J, Seidel Z, Doležal O, Rexová P, Zálišová M. Is it possible to actively and purposely make use of plasticity and adaptability in the neurorehabilitation treatment of Multiple Sclerosis patients? Pilot Project. Clinical Rehabilitation 2005;19:170-181.

14. Nociti V, Santoro M. What do we know about the role of lncRNAs in multiple sclerosis? Neural Regeneration Research 2021;16(9):1715-1722.

15. Sun D, Yu Z, Fang X, Liu M, Pu Y, Shao Q, Wang D, Zhao X, Huang A, Xiang Z, Zhao C, Franklin RJM, Cao L & He C. LncRNA GAS5 inhibits microglial M2 polarization and exacerbates demyelination. EMBO Reports 2017;18:1801-1816.

16. Ding Y, Li T, Yan X, Cui M, Wang C, Wang S, Zhang F, Zhang R. Identification of hub lncRNA ceRNAs in multiple sclerosis based on ceRNA mechanisms. Molecular Genetics and Genomics 2021; 296:423-435. doi.org/10.1007/s00438-020-01750-1

17. Bahrami T, Taheri M, Omrani MD, Karimipoor M. Associations between genomic variants in lncRNA-TRPM2-AS and lncRNA-HNF1A-AS1 genes and risk of multiple sclerosis. Journal of Molecular Neuroscience 2020;70:1050-1055.

doi.org/10.1007/s12031-020-01504-z

18. Senousy MA, Shaker OG, Sayed NH, Fathy N, and Kortam MA. LncRNA GAS5 and miR-137 polymorphisms and expression are associated with multiple sclerosis risk: mechanistic insights and potential clinical impact. ACS Chemical Neuroscience 2020;11:1651-1660. dx.doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00150

19. De Laere M, Berneman ZN, and Cools N. To the brain and back: migratory paths of dendritic cells in multiple sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol 2018;77(3):178–192. doi: 10.1093/jnen/nlx114

20. Flórez-Grau G, Zubizarreta I, Cabezón R, Villoslada P, and Benitez-Ribas D. Tolerogenic dendritic cells as a promising antigen-specific therapy in the treatment of multiple sclerosis and neuromyelitis optica from preclinical to clinical trials. Frontiers in Immunology 2018;9:1169. doi: 10.3389/fimmu.2018.01169