

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Neurovědy



MUDr. Jana Svatoňová

**Biologické chování beta2-mikroglobulinu v likvoru u klinicky definovaných
nosologických jednotek**

*Biological behaviour of beta2- microglobulin in liquor in clinically definated
nosological units*

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Doc. MUDr. Pavel Adam,CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a 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, 22.9.2014

Jana Svatoňová

Identifikační záznam:

Pro tvorbu identifikačního záznamu se řiďte normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.

SVATOŇOVÁ, Jana. *Biologické chování beta2-mikroglobulinu v likvoru u klinicky definovaných nosologických jednotek. [Biological behaviour of beta2-microglobulin in liquor in clinically definated nosological units]*. Praha 2014 . 80s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika neurologie. Vedoucí závěrečné práce Pavel Adam.

SVATOŇOVÁ, Jana. *Biologické chování beta2-mikroglobulinu v likvoru u klinicky definovaných nosologických jednotek.*

Abstrakt:

Cílem práce bylo v základní teoretické části shrnutí základních informací o likvoru. Stručný popis likvorologických cytologických nálezů včetně obrazové dokumentace. Podrobněji je práce věnována bílkovině beta2-mikroglobulinu/ základní popis molekuly, vyšetřování, význam jeho vyšetřování/. V další části seznámení s vyšetřováním tohoto proteinu ve světě, význam vyšetřování, závěry publikovaných prací v souvislosti s jeho vyšetřováním u rozličných nemocí. Vlastní sledování bylo prováděno u rozsáhlé skupiny pacientů – celkem 26 378 vzorků likvoru v letech 1999-2006 ve věkovém rozmezí od 3 do 86 let.

Odběry byly prováděny po celé republice a vzorky zpracovány v biochemické laboratoři Na Homolce. Tato rozsáhlá skupina byla rozdělena podle diagnóz do 4 základních skupin. V jednotlivých skupinách byla spočítána průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu a směrodatná odchylka. Byly porovnány hladiny tohoto proteinu ve skupinách mužů a žen, ve věkových skupinách. Výsledky byly zpracovány v grafické podobě. V závěru práce je celkové shrnutí výzkumu - důležitost vyšetřování beta2-mikroglobulinu, porovnání hladin proteinu v jednotlivých skupinách podle diagnóz. Velikost souboru dává velkou výpovědní hodnotu – nejedná se tedy o náhodné výsledky.

Klíčová slova:

Likvor, biochemické vyšetření likvoru, spektrofotometrické vyšetření, cytologické nálezy, imunologické vyšetření, funkce likvoru, patologické nálezy, virová onemocnění, bakteriální onemocnění, protilátkový index, beta2-mikroglobulin, vyšetřování beta2-mikroglobulinu, metodika vyšetřování, demyelinizační onemocnění, neuroboreliosa, výsledky.

SVATOŇOVÁ Jana: *Biological behaviour of beta2- microglobulin in liquor in clinically definated nosological units*

Abstract:

The objective of this work, namely of its theoretical part, was to sum up basic information about liquor. A brief description of liquorological cytological findings including picture documentation. This work is in more details dedicated to protein beta2-microglobulin/essential description of a molecule, examination, the importance of its examination/. The following parts show methods applied worldwide for this protein examination, the importance of its examination, and conclusions of works published in connection with its examination in different diseases. The follow-up itself was carried out in a large group of patients – in total 26,378 liquor samples taken between 1999-2006, the age limit ranging from 3 to 86 years. Samples were taken practically all over the whole Czech Republic and elaborated in a biochemical laboratory Na Homolce. This large group of patients was divided into 4 essential groups according to their diagnoses. An average value of beta2-microglobulin and standard deviation was calculated in individual groups. Levels of this protein were compared between groups of men and women, at age groups. The outcomes were worked into a graphical form. Conclusion of this work provides a total summarization of research – the importance of examination of beta2-microglobulin, comparison of protein levels in individual groups according to their diagnosis. The extension of the group provides a considerable predicative value – thus no random results are in question.

Key Words:

Liquor, biochemical liquor examination, liquor spectrophotometric examination, liquor cytology, immunological examination, functions of liquor, pathological findings, viral diseases, bacterial diseases, antibody quotient, beta2-microglobulin, examination of beta2-microglobulin, demyelination diseases, neuroborreliosis, results.

**BIOLOGICKÉ CHOVÁNÍ
BETA2–MIKROGLOBULINU V LIKVORU
U KLINICKY DEFINOVANÝCH
NOSOLOGICKÝCH JEDNOTEK**

MUDr. Jana Svatoňová

OBSAH DIZERTAČNÍ PRÁCE

Obsah dizertační práce.....	2
1. Úvod	4
2. Soubory vyšetření v mozkomíšním moku	5
3. Bariérové systémy	7
4. Dynamika proteinů pocházejících primárně z nervového systému	10
5. Biochemické vyšetření likvoru.....	10
6. Nejčastěji sledované frakce proteinů akutní fáze:.....	13
7. Strukturální proteiny CNS	15
8. Elektroforetické dělicí metody.....	16
9. Intrathékální produkce specifických protilátek.....	18
10. Protilátkový index	19
11. Autoprotilátky	20
12. Spektrofotometrické vyšetření likvoru	21
13. Cytologie likvoru.....	23
14. Patologické cytologické nálezy v likvoru	29
15. Syndromologická klasifikace likvorových cytologických nálezů	39
16. Beta2-mikroglobulin	43
17. Cíl práce	55
18. Soubor pacientů a metodika	57
19. Výsledky.....	60
20. Diskuze	72
21. Závěr	73

1. ÚVOD

Za fyziologických podmínek je likvor /CSF/ čirou bezbarvou kapalinou, která se nachází v komorovém systému mozku, v cisternách a v subarachnoidálních prostorech mozku a míchy.

Mozek i mícha jsou kryty třemi membránami. Zevní kryt – dura mater, uprostřed arachnoidea, na vnitřní straně je pia mater. Mozkomíšní mok je obsažen v prostoru subarachnoidálním, jenž ohraničuje na vnitřní straně pia mater, která sleduje mozkové závitě. Zevní list tohoto prostoru je tvořen arachnoideou, přiléhající volně k dura mater.

Cirkulace likvoru začíná v intersticiálních prostorech drénujících mozkovou a míšní tkáň, je produkován v chorioidálních plexech. V makroskopických likvorových prostorech cirkuluje z obou postranních komor přes foramen Monroi do III. komory a Sylviovým kanálkem do IV. komory, odtud přes foramina Luschkae do mostomozečkových koutů a přes foramen Magendi do cerebromedulární cisterny. Odtud se dělí – část nad mozečkové hemisféry, část po bázi přes premedulární, prepontinní a interkrurální cisterny a dále frontálně a laterálně na přední část konvexity a dorzálně přes cisternae ambientes a cisternae venae magnae cerebri do interhemisferálního subarachnoidálního prostoru a nad okcipitální laloky, nejmenší část do zadního spinálního prostoru.

Resorpce likvoru probíhá v Pacchionských granulacích a durálních sinech, kde je vypouštěn do venózního oběhu. Hnací silou pro přestup likvoru do venózní krve je tlakový rozdíl mezi arteriální a venózní krví.

Funkce likvoru je komplexní - obklopuje mozek a míchu a chrání je před otřesy, slouží k vyrovnávání tlakových poměrů nitrolebečních a nitropáteřních spolu s venózním systémem. Plní regulační a ochrannou

funkci při změnách teploty a atmosferického tlaku, účastní se na metabolismu neuronů, na odstraňování produktů katabolismu a na imunologických procesech.

Průměrné množství likvoru u dospělého člověka je asi 140 ml, průměrná denní produkce likvoru je asi 500 ml s průměrnou rychlostí cirkulace 0,3 ml/hod. Rychlost likvorové cirkulace se mění s věkem a má zásadní význam pro koncentraci likvorových proteinů.

Normální hodnoty likvorového tlaku jsou vleže 0,59 – 1,96 kPa /60 – 200 mm H₂O/, u sedícího pacienta 3,92 kPa/ 400 mm H₂O/.

K odběru likvoru se používá nejčastěji lumbální punkce /LP/. Provádí se u ležícího či sedícího pacienta. Poloha pacienta má vliv na hodnoty likvorového tlaku /viz výše/.

Likvor by měl být odebrán alespoň do 3 zkumavek; postupný odběr do více zkumavek umožní posouzení arteficiální příměsi erytrocytů, při němž dochází k postupnému čerění vytékajícího moku – u pravého intermeningeálního krvácení zůstává intenzita růžového či červenavého zbarvení neměnná.

Relativní kontraindikací provedení odběru moku lumbální punkcí je přítomnost mozkevého edému a syndromu nitrolebni hypertenze, dále záněty v oblasti provedení punkce, koagulační defekty a antikoagulační terapie, vrozené a získané deformity páteře.

(1,2,3,39)

2. SOUBORY VYŠETŘENÍ V MOZKOMÍŠNÍM MOKU

2.1. Akutní vyšetření

- makroskopický popis mozkomíšního moku
-

- celková bílkovina
- kvantitativní a orientačně kvalitativní cytologie
- laktát

2.2. Základní vyšetření

- makroskopický popis
- celková bílkovina
- kvantitativní a kvalitativní cytologie
- laktát a glukóza v likvoru
- albumin, IgG, IgA, IgM v likvoru a v séru
- oligoklonální IgG v likvoru a v séru
- specifické protilátkové indexy /AI - antibody indices/ ve třídě IgG u příslušných indikací: spalničky, zarděnky a virus planých neštovic, tzv. MRZ reakce, dále AI pro HSV, HIV, CMV, Toxoplasmosa gondii, Borrelia burgdorferi ve třídě IgM a IgG, Treponema palidum
- počet erytrocytů a přítomnost hemoglobinu

2.3. Rozšířené vyšetření

- PCR při podezření na HSV encefalitidu, tuberkulózu a oportunní infekce/CMV infekce, toxoplazmóza/
- tumorový marker – karcinoembryonální antigen v likvoru a séru
- stanovení CNS proteinů – např. neuronspecifické enolázy v séru jako markeru postižení nervové tkáně po hypoxii, tau-protein, beta-amyloid – při diagnostice demencí, ...
- beta-trace protein k určení přítomnosti likvoru v nazálním sekretu

(45,46)

3. BARIÉROVÉ SYSTÉMY

Výměna látek mezi krví, likvorem a nervovou tkání je regulována bariérami, které vytvářejí 4 kompartmenty důležité pro účely likvorové diagnostiky:

1. intravaskulární kompartment tvořený luminy kapilár mozkového parenchymu, chorioidálního plexu a leptomening
2. intracelulární prostor nervových a gliových buněk
3. extracelulární prostor mezi nervovými a gliovými buňkami otevřený k likvorovému prostoru, tvořený výběžky glie a neuronů
4. likvorový kompartment tvořený mozkovými komorami, bazálními cisternami, subarachnoidálním prostorem a úzkou zónou přiléhajícího extracelulárního prostoru

Mezi jednotlivými kompartmenty jsou následující bariérové systémy s různými transportními mechanismy:

1. hematoencefalická bariéra tvořená pevnými spojeními mozkových kapilár s převážně transendoteliálním transferem lipofilních substancí mechanismem specifických transportních mechanismů
 2. hematolikvorová bariéra tvořená chorioidálním plexem a endotelem kapilár s dominantním mechanismem přestupu proteinů do likvoru difuzí a se specifickými transportními systémy pro aminokyseliny, elektrolyty a cukry
 3. intra/extracelulární bariéra především s transmembranózním transferem a specifickými transportními systémy
-

Hematoencefalická bariéra a intra/extracelulární bariéra jsou lipidové bariéry dovolující průnik lipofilních molekul do velikosti cca 500 Da a zadržující většinu hydrofilních molekul. Mezi likvorovým a extracelulárním kompartmentem existuje difuzní ekvilibrium. Hematolikvorová bariéra je relativně propustná pro hydrofilní molekuly a v širším smyslu zahrnuje všechny procesy ovlivňující definitivní koncentraci proteinů v lumbálním likvoru.

Všechny krevní proteiny prostupují kapilární stěnou mechanismem pasivní difuze do mozku, extracelulární tekutiny a likvoru. Větší molekuly (např. IgM) prostupují pomaleji a vytvářejí strmější hematolikvorový koncentrační gradient než molekuly menší /např. albumin/. Zvýšení koncentrace jednotlivého proteinu v séru má za následek vyšší koncentraci téhož proteinu v likvoru, avšak gradient zůstává konstantní, což může být adekvátně vyjádřeno poměrem koncentrace proteinu v likvoru a séru - tzv. koncentračním kvocientem Q .

Např. pro albumin $Q_{\text{alb}} = \text{CSF alb} / \text{sérum alb}$.

Stupeň cirkulace likvoru je hlavním faktorem ovlivňujícím koncentraci proteinů v likvoru, tzn. snížení průtoku likvoru má za následek zvýšení koncentrace sérových proteinů.

Albuminový kvocient Q_{alb} je obecně přijímaným indikátorem funkce hematolikvorové bariéry zahrnující stupeň likvorového průtoku. Zvýšená koncentrace albuminu v likvoru je vždy důsledkem dysfunkce hematolikvorové bariéry, neboť albumin pochází výlučně z krve.

Redukce stupně likvorového průtoku může být způsobena:

- sníženou tvorbou likvoru
- omezením průtoku v subarachnoidálním prostoru

- blokádu resorpce likvoru v arachnoidálních klících

Obecně patologické zvýšení koncentrace proteinu, např. IgG v likvoru, je zapříčiněno dysfunkcí hematolikvorové bariéry nebo intrathekální syntézou IgG.

K rozlišení mezi těmito dvěma příčinami je nutné porovnat Q IgG versus Q alb.

V důsledku permanentní difuze sérových proteinů do likvoru v subarachnoidálním prostoru podél likvorových cest stoupá koncentrace proteinů mezi ventrikulárním a lumbálním likvorem.

Vztah mezi Q alb a Q IgG není lineární a je nejlépe vyjádřen numericky i graficky hyperbolickou závislostí.

Hyperbolická závislost byla nejprve určena empiricky, později potvrzena zákony difuze a závislostí koncentrace proteinů na stupni průtoku mozkomíšního moku.

Na základě této teorie byl stupeň cirkulace mozkomíšního moku určen jako hlavní modulátor obsahu proteinů v likvoru, a to proteinů jak krevního, tak intrathekálního původu. Redukovaný stupeň cirkulace likvoru má za následek zpočátku lineární vzestup koncentrace proteinů, vzrůstající koncentrace podél dráhy cirkulujícího likvoru vede k narůstajícímu množství difundujících proteinů za jednotku času z krve do likvoru a tento cyklus narůstající koncentrace a zvyšujícího se molekulárního, resp. proteinového přestupu přes bariéru vytváří mechanismus pozitivní zpětné vazby.

(45,40,41,39,1,2,3,4,39)

4. DYNAMIKA PROTEINŮ POCHÁZEJÍCÍCH PRIMÁRNĚ Z NERVOVÉHO SYSTÉMU

Je odlišná od dynamiky proteinů pocházejících z krevního séra. Hlavní frakce proteinů v normálním likvoru /cca 80%/ je tvořena proteiny séra se značným podílem albuminu. Asi 20% vzniká intrathekálně z mozkového parenchymu a leptomening, výjimečně jsou specifické pro nervový systém.

Základním rysem těchto predominantně mozkových proteinů je jejich vyšší koncentrace v likvoru ve srovnání se sérem, což indukuje jejich difuzi směrem z likvoru do krevního séra.

5. BIOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ LIKVORU

Spektrum biochemických vyšetření likvoru stále narůstá s rozvojem laboratorních metodik. V zásadě by vždy mělo být vyšetřeno:

- hladina celkové bílkoviny
- hladina glukózy
- stanovení hladiny imunoglobulinů a albuminu
- stanovení hladiny proteinů akutní fáze

Mělo by být provedeno vyšetření spektrofotometrické, které nás informuje o přítomnosti hematogenních pigmentů.

5.1. Celková bílkovina

Za normální lze považovat u dospělého člověka hladinu mezi 0,20 až 0,45 g/l, u novorozenců lze považovat za normální až hodnotu 0,90g/l a u lidí nad 60 let věku až do 0,60g/l.

Zvýšení hladiny celkové bílkoviny může být způsobeno jednak poruchou hemato-likvorové bariéry – do likvoru proniká zprvu albumin a při výrazné poruše bariéry i imunoglobuliny, příp. možností intrathekální tvorby imunoglobulinů v CNS.

Zvýšení hladiny celkové bílkoviny je patologickým jevem a je obecně součástí likvorových syndromů proteinocytologické asociace / při současném zmnožení počtu buněk / nebo protienocytologické disociace / při normálním počtu elementů/.

5.2. Glukóza

Hladina glukózy dosahuje za normálních okolností asi 2/3 hladiny v séru – cca 2,2 – 4,2 mmol/l.

Zvýšení hladiny glykorachie lze pozorovat často u diabetiků, kde odráží celkově vysokou hladinu glukózy v séru. Dále bývá někdy vyšší u virových neuroinfekcí, kde může být i nižší. Výrazně nízké hladiny glukózy jsou typické u hnisavých meningitid.

5.3. Laktát

Je důležitým parametrem mozkového metabolismu. Hladina není závislá na plasmatické koncentraci laktátu.

Laktát vzniká v CNS v případě anaerobní glykolýzy. Za normálních podmínek přestupuje hematoencefalickou bariéru v malém množství. Při bakteriálních meningitidách hladina vzrůstá až dvojnásobně.

5.4. Albumin a imunoglobuliny

Hladiny imunoglobulinů a albuminu musí být paralelně stanovovány v likvoru i v séru. Hematolikvorová bariéra vždy propouští určité množství proteinových frakcí, což odpovídá především jejich výchozí koncentraci v séru, dále upozorňuje na přítomnost poruchy bariéry hematolikvorové.

Hladiny jednotlivých imunoglobulinů v likvoru mohou být zvýšeny i přítomností jejich intrathekální syntézy v CNS, a to při poruše bariéry či izolovaně.

Pro výpočet stavu hematolikvorové bariéry a intrathekální syntézy imunoglobulinů bylo v klinické praxi používáno mnoho indexů a vzorců.

V současnosti se za nejuvhodnější považuje grafické znázornění funkce bariéry a možné přítomnosti syntézy imunoglobulinů dle Reibera. Provádí se pro imunoglobuliny IgG, IgA, IgM. Za nejpřínosnější se považuje stanovení hladiny IgG. Přítomnost jeho oligoklonální syntézy lze pozorovat u neuroinfekcí, zejména při přechodu do chronicity, velmi často u roztroušené sklerózy.

Albuminový kvocient odráží funkci hematolikvorové bariéry.

Jeho hladina se výrazně mění s věkem. U novorozenců je vysoká – při zvýšené propustnosti hematolikvorové bariéry.

5.5. Proteiny akutní fáze

Velmi perspektivní skupina likvorových proteinů, též nazývaná reaktanty akutní fáze.

Tyto proteiny přecházejí do likvoru ze séra. Jejich hladina v likvoru je závislá jednak na jejich výchozí hladině v séru, jednak na funkci hematolikvorové bariéry. Tyto bílkovinné frakce jsou integrální součástí

systemu humorální imunity a za jejich produkci jsou odpovědné interleukiny, které mohou stimulovat jaterní buňky k jejich tvorbě.

Tyto proteiny jsou syntetizovány v játrech a jejich výsledná hladina v likvoru je závislá na uvedených okolnostech.

Jedná se o mediátory zánětlivé reakce, a to ve smyslu plus i minus. Některé z těchto působků zabraňují např. poškození tkání zánětlivým procesem a jsou pak nazývány reaktanty negativními. Tyto proteiny zprostředkovávají aktivaci mezenchymálních elementů monocytární řady v elementy makrofagické, ovlivňují nástup, ukončení a rozsah úklidové makrofagické reakce. Většina těchto frakcí patří mezi alfa 1 a alfa 2 globuliny. Změny jejich hladin, např. u zánětlivých onemocnění, jsou podkladem tzv. alfa-inverze popisované v elektroforéze likvoru.

Sledování hladin některých reaktantů akutní fáze může mít značný význam i pro zjištění maligního procesu CNS.

6. NEJČASTĚJI SLEDOVANÉ FRAKCE PROTEINŮ AKUTNÍ FÁZE:

6.1. CRP – C – reaktivní protein

Stanovení považujeme za významné u hnisavých neuroinfekcí. Jeho normální hladiny možnost bakteriálního zánětu prakticky vylučují. U ostatních zánětlivých afekcí bývá hůře stanovitelný marker při velmi nízké iniciální hladině v likvoru. Velký význam je při odlišení virové a bakteriální infekce.

6.2. Orosomukoid

Kyselý glykoprotein z alfa1 frakce globulinů. U zánětlivých chorob jeví jeho hladina zřetelný vzestup. Velmi výrazný vzestup může provázet maligní onemocnění.

6.3. Prealbumin

Negativní reaktant. V likvoru dosahuje vysokých koncentrací proti koncentracím sérovým.

6.4. Alfa 1-antitrypsin a alfa 1-antichymotrypsin

Negativní reaktanty zánětlivé fáze. Tyto látky blokují účinek enzymů, čímž eliminují tkáňové poškození zánětlivým procesem.

6.5. Alfa 2 – ceruloplasmin

Význam spočívá v tom, že se jedná o transportní mechanismus pro měď. Je typickým proteinem akutní fáze.

6.6. Transferin

Transportní mechanismus pro železo, reaktant zánětlivé fáze.

6.7. Fibrinogen

Účastní se hemokoagulace, protein akutní fáze. V likvoru je zodpovědný za vznik síťky u kompresivních likvorových syndromů a za vznik Froinova syndromu. Za normálních okolností je jeho hladina velmi nízká.

6.8. C3, C4

Komponenty komplementového systému, proteiny akutní fáze.

7. STRUKTURÁLNÍ PROTEINY CNS

Tato skupina je též nazývána stopovými bílkovinami /trace proteins/ pro jejich velmi nízkou hladinu v likvoru.

Tyto proteiny nejsou sérového původu, ale jedná se o bílkovinné frakce syntetizované v CNS. V séru jsou buď zcela nepřítomny, nebo jestliže pronikají hematolikvorovou bariérou, jsou přítomny i v séru, ovšem ve stopových až neměřitelných koncentracích. Některé z nich mají vztah k neuroinfekcím.

7.1. Gama trace protein

Zvýšení hladiny je nespecifickou známkou přítomnosti rozpadu mozkové tkáně.

7.2. Bazický protein myelinu

Zvýšení hladiny je u roztroušené sklerózy, leukoencefalitid, vaskulárních lézí CNS.

7.3. GFAP – astroprotein – Glial Fibrillary Acidic Protein

Produkován astrogliálními elementy CNS. Zvýšení hladiny u neuroinfekcí, roztroušené sklerózy, tumorů z gliových buněk, ...

7.4. Beta – trace protein

Zvýšení hladiny je u ischemických cévních lézí, infiltrativně rostoucích tumorů, roztroušené sklerózy, infekčních onemocnění CNS.

7.5. Protein S 100

Zvýšení hladiny u neuroinfekcí, kontuzí mozku. S – 100B spolu s tau proteinem - velmi důležité při stanovení diagnózy Creutzfeldt-Jakobovy choroby. Senzitivita a specificita stanovení hladiny těchto proteinů je kolem 90%. Zvýšení hladiny S – 100B představuje astrogliální aktivitu

a možnou destrukci, zatímco zvýšení tau proteinu je v důsledku ztráty neuronů.

7.6. Bazický protein myelinu

Protein s vysokým obsahem bazických aminokyselin, který je součástí myelinu. Jeho stanovování je používáno výzkumně, ale i v klinické praxi – u roztroušené sklerózy, u neuroinfekcí. Je považován za významný antigen, který je schopen senzibilizovat a stimulovat imunitní systém jedince k autoagresi.

7.7. Tau protein

Je protein intraneuronální, mikrotubuly stabilizující protein, primárně se nacházející v axonech. Hladina je závislá na věku, zvýšení je spojené se stupněm neuronálního poškození. Vysoce zvýšená hladina je u degenerativních onemocnění – např. Alzheimerovy demence, Creutzfeld–Jakobovy choroby, akutního mozkového infarktu. Normální hladina – např. u depresí, demence při alkoholické encefalopatii, Parkinsonově chorobě. Zvýšená hladina je rovněž u sclerosis multiplex v časných formách. Spolu s S - 100 B – zvýšení u CJD /Creutzfeld–Jakobovy choroby/. Dále hladina stoupá spolu s GAP 43 /Growth–associated protein/ a beta amyloidem 42 u frontotemporální demence, Alzheimerovy demence, vaskulární demence. Zvýšení tau proteinu je v důsledku neuronální a axonální degenerace.

(1,2,3,4,5)

8. ELEKTROFORETICKÉ DĚLÍCÍ METODY

Elektroforéza na papíře je již prakticky opuštěna.

Novější elektroforetickou metodikou je izoelektrická fokuzace.

Izoelektrická fokuzace je elektroforéza, která dělí bílkoviny mozkomíšního moku a séra v gradientu pH podle jejich izoelektrických bodů /pI/.

Aminokyseliny v bílkovinách mají amfoterní vlastnosti, tzn. že bílkoviny mohou mít záporný náboj při hodnotách pH vyšších než je jejich pI a kladný náboj při nižších hodnotách pH. Izoelektrický bod je pH, při kterém má bílkovina nulový náboj.

Bílkoviny během izoelektrické fokuzace putují do svých pI, kde se fokuzují – koncentrují.

Po rozdělení bílkovin moku a séra izoelektrickou fokuzací jsou možné 4 typy detekcí:

1. barvení v gelu
2. barvení v gelu po imunofixaci
3. blottování na membránu /nejčastěji nitrocelulózovou/ s následnou imunodetekcí
4. blottování na membránu impregnovanou protilátkou proti lidskému IgG s následnou imunodetekcí - tzv. afinitivní imunoblotting

Stanovení oligoklonálního IgG izoelektrickou fokuzací s následným imunoenzymatickým barvením představuje nejčastěji užívanou komplementární metodu k diagnostice zánětlivého procesu s intrathékální IgG syntézou. Kvalitativní stanovení IgA a IgM je rovněž možné, ale méně senzitivní než detekce oligoklonálního IgG.

Na základě mezinárodního konsenzu je navrženo 5 typů možných výsledků při párové analýze likvoru a séra:

- Typ 1. Normální likvor
- Typ 2. Oligoklonální IgG pouze v likvoru /např. sklerosis multiplex/

- Typ 3. Oligoklonální IgG v likvoru a jiné identické pásy v likvoru a séru /např. neuroborelióza/
- Typ 4. Identické oligoklonální pásy v likvoru a v séru /např. paraneoplastické syndromy/
- Typ 5. Monoklonální pásy v likvoru a séru /myleom nebo monoklonální gamapatie/

Pásy se obvykle nacházejí v alkalické oblasti elektroforetického pole.

Z hlediska neurologické diagnostiky jsou významné typy 1, 2, 3. V případě nálezů pod bodem 3 a 4 dostáváme další informaci, neboť oligoklonální pásy v séru jsou typické pro řadu jiných onemocnění, např. Guillanův-Barreho syndrom, zánětlivé polyneuropatie.

(39,41)

9. INTRATHÉKÁLNÍ PRODUKCE SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK

Případy, kdy se podaří z mozkomíšního moku izolovat mikroorganismus odpovědný za vznik závažného onemocnění mozku nebo míchy, jsou ojedinělé.

Efektivnější je sledování specifických protilátek, jejichž tvorbu mikroorganismus vyvolal.

Existuje několik metod, které nám to umožňují:

1. Výpočet protilátkových indexů, které informují o intrathékální produkci specifických protilátek na základě stanovení ELISA technikou.

2. Capture ELISA, specifické protilátky jsou vychytávány na nespecifické anti-IgG, resp. anti-IgM protilátky; detekce se provádí se značeným antigenem, proti kterému je namířena specifická protilátka. Pokud jsou v mozkomíšním moku vyšší titry specifických protilátek než v séru, svědčí to pro lokální onemocnění.
3. Imunoblotting, antigeny mikroorganismu jsou elektroforeticky rozděleny podle svých molekulových hmotností, přeneseny na nitrocelulóзовou membránu a pak inkubovány s mozkomíšním mokem a se sérem, srovnává se počet a intenzita vybarvených pásů, pro lokální onemocnění svědčí vyšší počet a intenzivnější vybarvení pásů po inkubaci s mozkomíšním mokem ve srovnání se sérem.
4. Afinitní imunoblotting, specifické protilátky rozdělené izoelektrickou fokuzací jsou vychytávány na nitrocelulóзовou membránu nasycenou antigenem, proti kterému je namířená specifická protilátka. Pokud je v mozkomíšním moku vyšší počet pásů nebo jsou intenzivněji vybarveny než v séru, svědčí to pro intrathekální produkci specifických protilátek.
5. Měření specifických protilátek produkovaných lymfocyty izolovanými z mozkomíšního moku a kultivovanými in vitro.

(39,41)

10. PROTILÁTKOVÝ INDEX

Molekuly imunoglobulinů přecházejí ze systému do CNS i za fyziologických podmínek, tj. při neporušené hematolikvorové bariéře. Porovnáním stanovení koncentrací celkového nespecifického imunoglobulinu v moku a v séru s koncentracemi specifického imunoglobulinu můžeme zjistit, zda koncentrační poměr – kvocient je

u specifického Ig stejný jako u celkového nespecifického IgG nebo zda je vyšší. Pokud je vyšší, dochází k intrathékální produkci specifických protilátek, jde o imunitní odpověď proti danému antigenu přímo v CNS.

Poměr těchto kvocientů se nazývá protilátkový index.

(,2,3,4,45,39,40,41)

Průkaz virových a bakteriálních antigenů:

Používají se ELISA techniky, imunoblotting, PCR – polymerázové řetězové reakce. Tuto citlivou metodu lze použít k průkazu virů a bakterií u neuroinfekcí pouze tehdy, pokud jsou v moku přítomny.

11. AUTOPROTILÁTKY

11.1. Anti-MBP protilátky /proti bazickému proteinu myelinu/

Poprvé byly zjištěny u pacientů s roztroušenou sklerózou. Antigenem je bazický protein myelinu. Stanovuje se metodou RIA.

Anti-MBP protilátky jsou senzitivním markerem demyelinizačního procesu.

11.2. Anti-MAG protilátky /proti glykoproteinu asociovanému s myelinem – Myelin Associated Glycoprotein/

Antigen – minoritní glykoproteinová komponenta myelinu centrálního i periferního nervového systému, strukturálně podobný některým adhezivním molekulám.

Protilátky proti MAG jsou většinou monoklonální imunoglobuliny třídy IgM, vyšetřujeme je v séru pacienta.

Indikací k vyšetření anti-MAG je především neuropatie spojená s monoklonální gamapatií IgM.

K detekci se užívá metoda ELISA nebo imunoblott.

11.3. Antiglykolipidové protilátky

Tyto protilátky se zřejmě přímo podílejí na patogenezi neuropatií. Stanovují se metodou ELISA. Velké množství je stanoveno např. u Guillain–Barrého syndromu.

12. SPEKTROFOTOMETRICKÉ VYŠETŘENÍ LIKVORU

Spektrofotometrické vyšetření nás informuje o přítomnosti hematogenních pigmentů v likvoru, má význam u příhod hemorhagických, subarachnoidálního krvácení, intraparenchymového mozkového hematomu a prokrvácených mozkových tumorů.

Spektrofotometrické vyšetření pomůže odlišit přítomnost arteficiálního krvácení.

Vyšetření se provádí ve spektru viditelného světla.

V likvoru lze bezpečně identifikovat hematogenní pigmenty: oxyhemoglobin, bilirubin, methemoglobin.

12.1. Oxyhemoglobin

Proniká do likvoru z rozpadajících se erytrocytů, mok se jeví jako růžový, červený. Absorpční pík oxyhemoglobinu je při 415 nm, je doprovázen dvěma píky vedlejšími.

Izolovaná přítomnost oxyhemoglobinu se vyskytuje u čerstvých intermeningeálních krvácení všeho druhu.

12.2. Bilirubin

Vzniká v buňkách mozkových a míšních obalů působením enzymu hemoxygenázy na oxyhemoglobin. Vzniklý bilirubin se dostává do likvorového prostoru, železo putuje do elementů retikuloendoteliálního systému a za pomoci transportních mechanismů pro železo je pak dále distribuováno.

Absorpční maximum bilirubinu kolísá mezi 430 a 460 nm, což je způsobeno tím, že lze odlišit dvě bilirubinové frakce – LB frakce a SB frakce.

Vzorek je při přítomnosti bilirubinu výrazně žlutý nebo nažloutlý.

12.3. Methemoglobin

Vzniká z hemoglobinu oxidací jeho dvojmocného železa na železo trojmocné, které váže kyslík, ten však již nemůže být uvolněn k utilizaci tkáním.

V likvoru se vyskytuje izolovaně pouze vzácně, často lze zaznamenat jeho přítomnost spolu s ostatními hematogenními pigmenty. Likvor má hnědavou barvu, která přechází do okrově žluté.

Absorpční maximum je při 406 až 408 nm.

Přítomnost methemoglobinu lze zaznamenat při krvácení do ohraničených uzavřených prostor CNS, např. při epidurálním hematomu, subdurálním hematomu, intraparenchymálním mozkovém hematomu či u prokrváčených mozkových tumorů.

(2,3,4,39,40)

13. CYTOLOGIE LIKVORU

Morfologické zhodnocení buněk v likvoru je významnou součástí likvorové diagnostiky. Buněčné elementy jsou stanoveny ve Fuchsově – Rosenthalově komůrce .

Cytologické vyšetření umožňuje:

- diagnózu zánětlivého likvorologického syndromu
- diagnózu patologického krvácení do likvoru
- diagnózu nespecifického iritačního likvorologického syndromu
- diagnózu nádorového onemocnění

13.1. Příprava cytologického preparátu

V klinické praxi jsou používány nejčastěji 3 následující metody:

- cytocentrifugační technika
- sedimentační technika
- filtrace

13.2. Metody barvení cytologického preparátu:

a. Konvenční metody

Těmito metodami získaný cytologický preparát je následně barven základním standardním barvením dle Maye-Grúnwalda-Giemsy s nabarvením buněčného jádra a cytoplazmy. V indikovaných případech jsou prováděna speciální barvení, např. dle Grama k diferenciaci bakterií, Ziehlovo-Nielsenovo barvení k průkazu mykobakterií, ...

b. Imunocytochemické metody

Diagnosticky relevantní antigeny mohou být vizualizovány imunochemickými metodami za použití příslušných monoklonálních protilátek. Protilátka značená enzymem umožňuje následnou barevnou reakci s příslušným substrátem. Tato metoda je nejčastěji užívána ke stanovení intracelulární přítomnosti imunoglobulinů třídy IgG, IgM, IgA v tzv. B aktivovaných lymfocytech nebo k typizaci nádorových buněk.

c. Molekulárně biologické metody

Tyto metody: in situ-hybridizace, in situ-PCR, nemají klinické rutinní využití, jsou používány hlavně ve výzkumu.

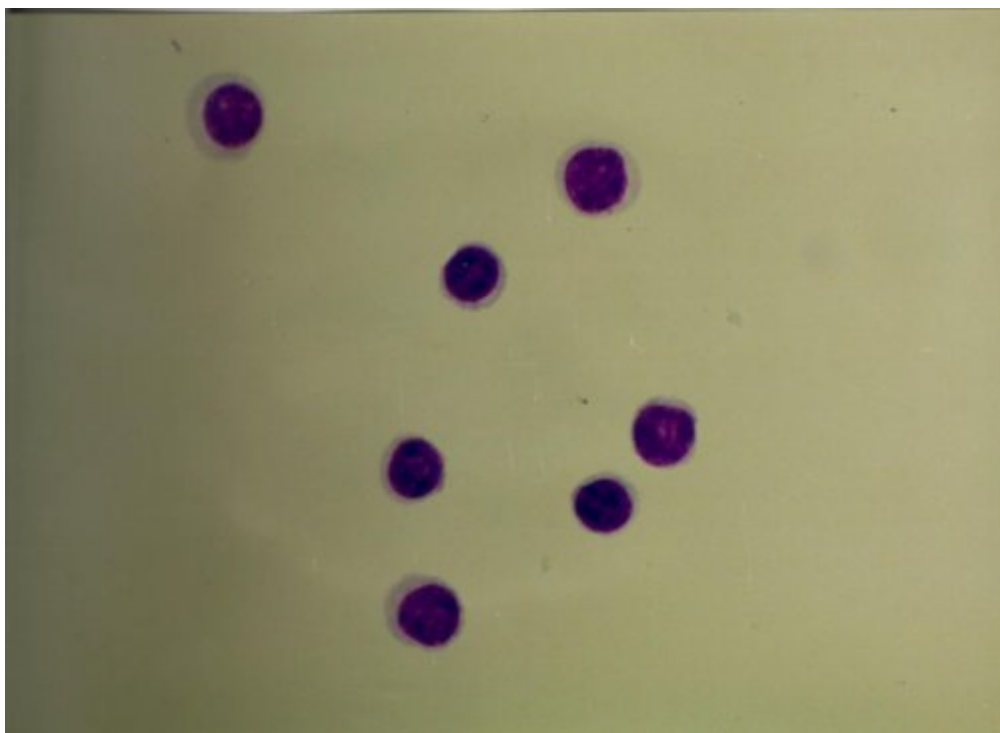
13.3. Fyziologické buněčné složení likvoru

Buňky v likvoru jsou pravděpodobně krevního původu. Jak dlouho tyto buňky zůstávají v perivaskulárním prostoru mening, než jsou uvolněny do likvoru, není známo. Rovněž není známo, zda lymfocyty z mozkového parenchymu přecházejí do likvoru.

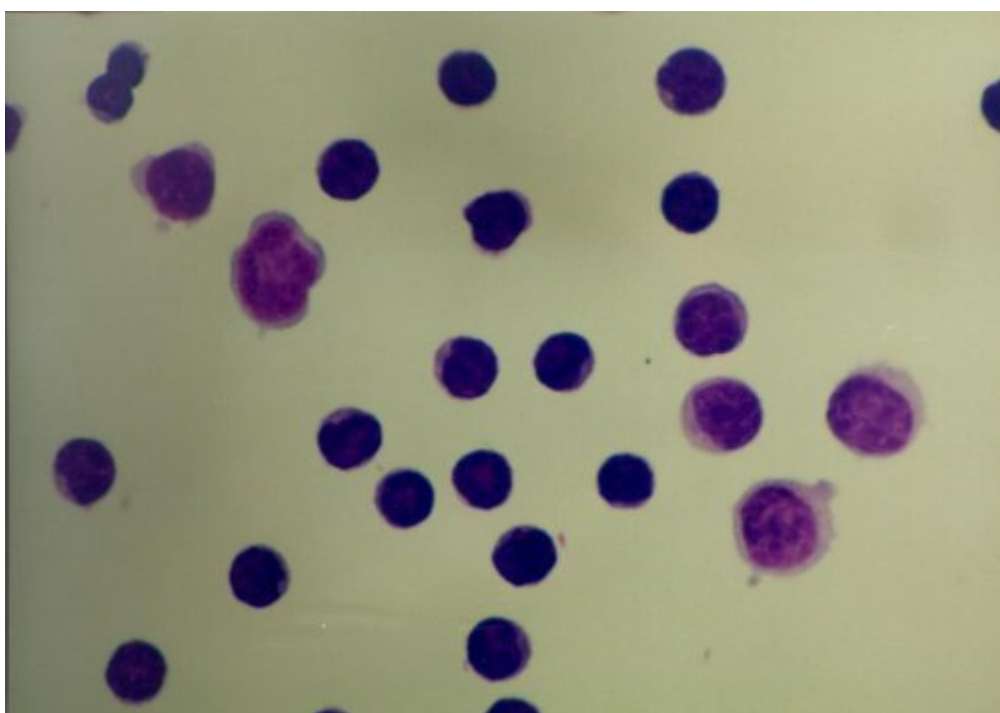
V lumbálním likvoru se vyskytují za normálních okolností 2 buněčné druhy: lymfocyty /70%/, monocyty /30%/. Erytrocyty a neutrofilní granulocyty jsou přítomny pouze v důsledku arteficiální krevní příměsi. V likvoru se mohou vyskytovat buňky chorioidálního plexu, ependymální buňky, arachnoidální buňky. Ty však nemají diagnostický význam.

(1,2,3,4)

Obrázek 1: Neaktivované lymfocyty



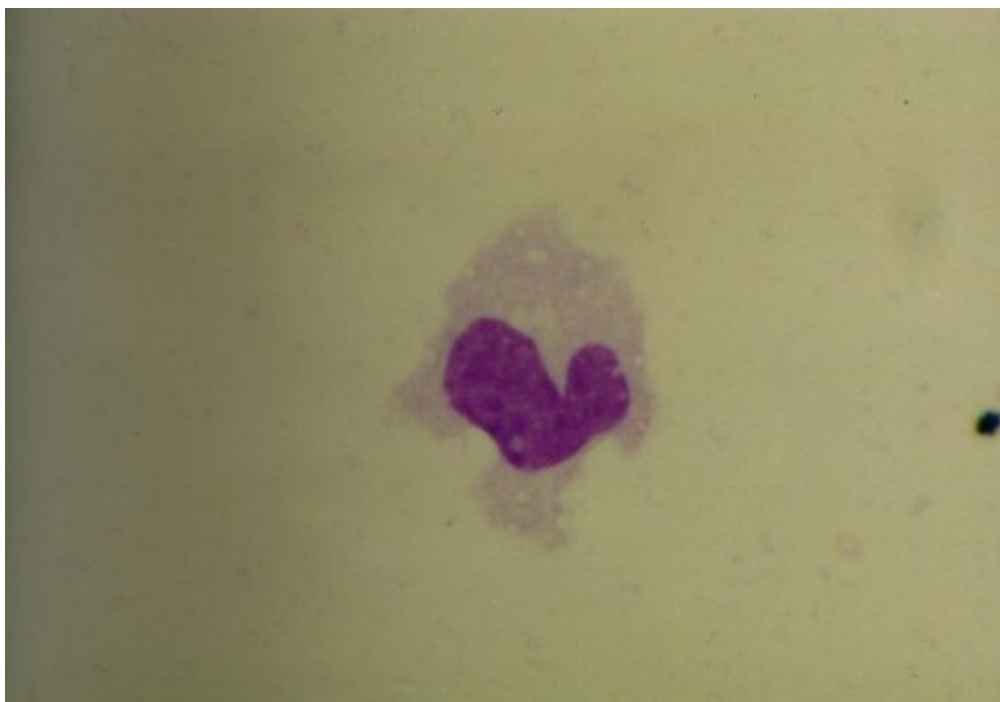
Obrázek 2: Neaktivované a aktivované formy lymfocytů



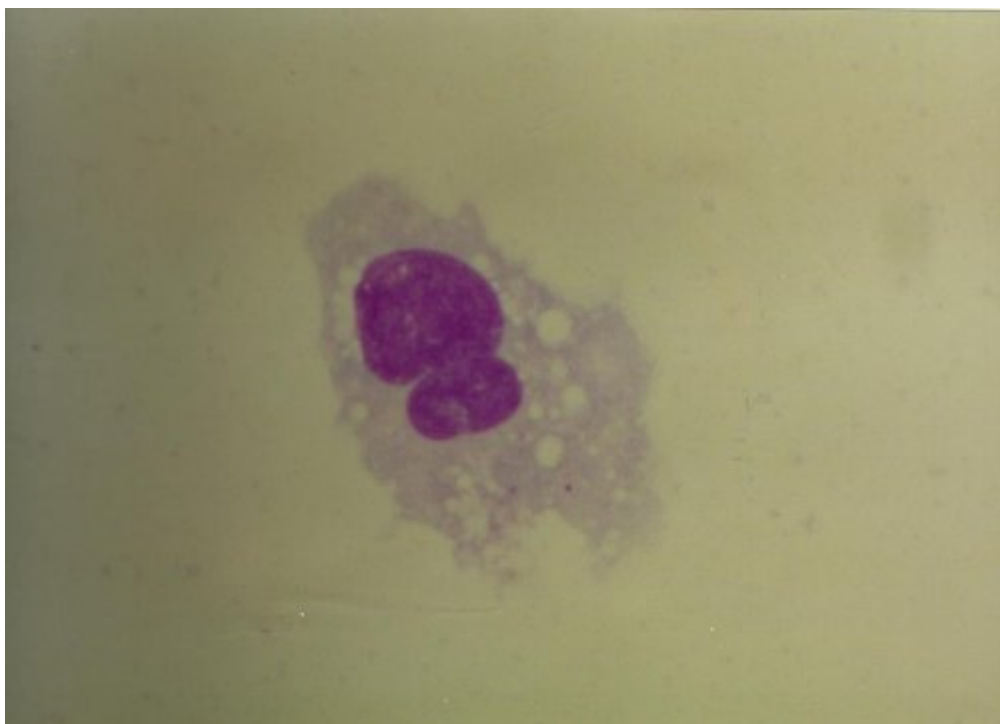
Obrázek 3: Neaktivovaný monocyt



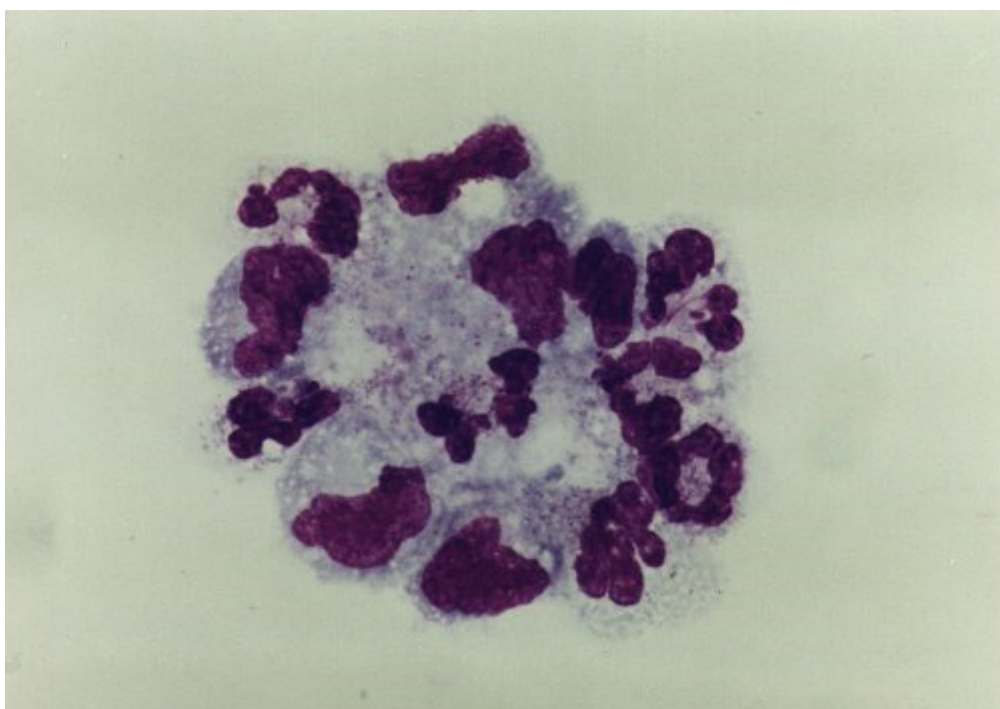
Obrázek 4: Monocyt se známkami aktivace



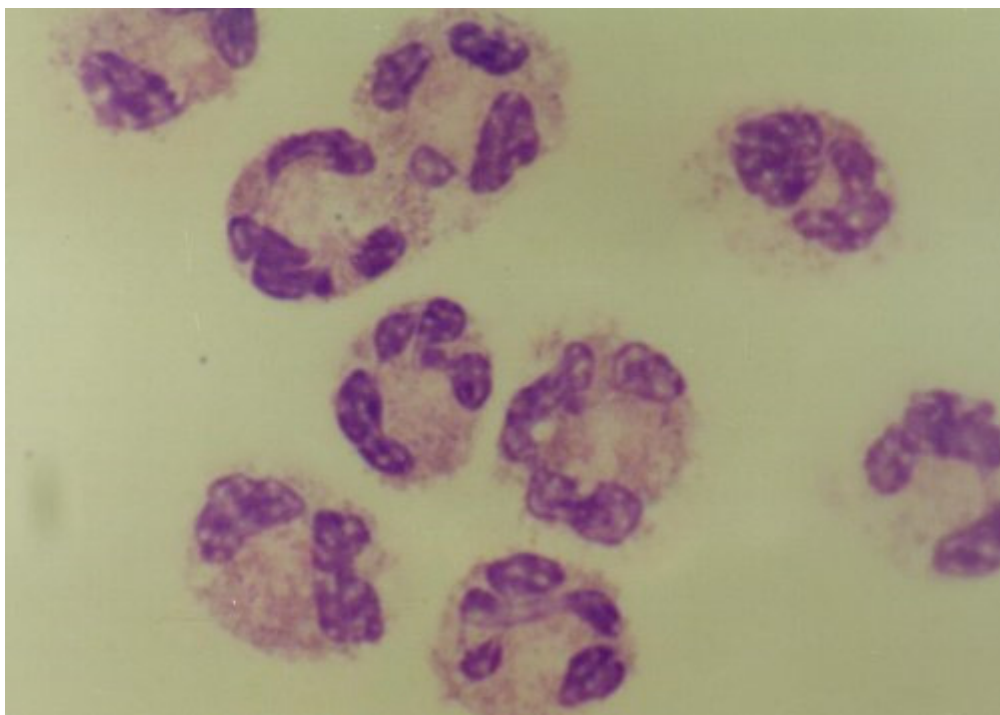
Obrázek 5: Aktivovaný monocyty



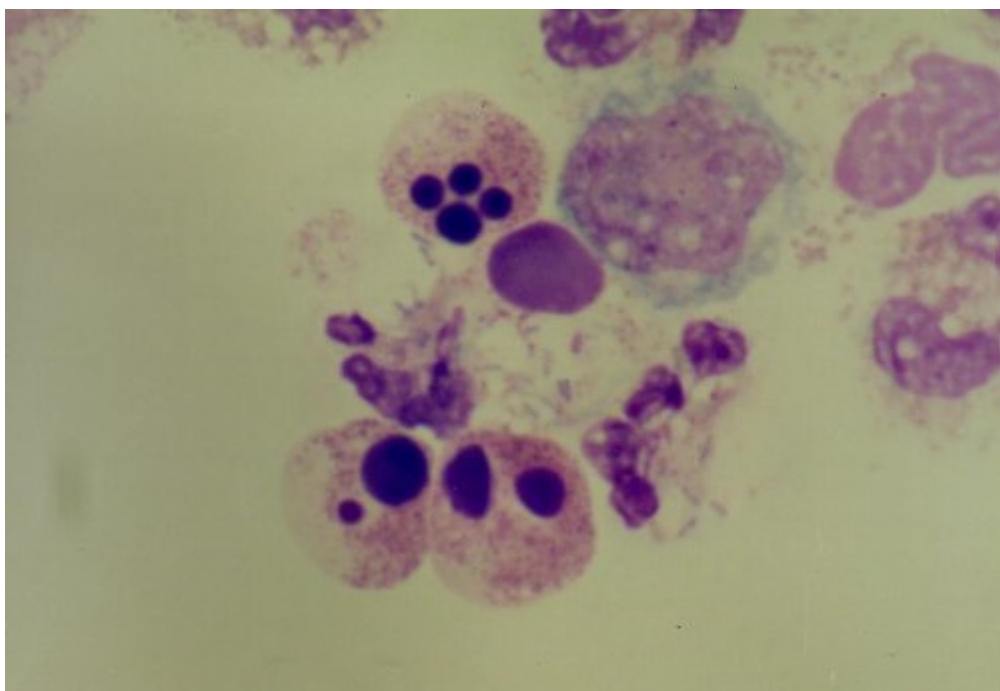
Obrázek 6: Monocyty a granulocyty



Obrázek 7: Neutrofilní granulocyty



Obrázek 8: Degenerativní formy neutrofilů



14. PATOLOGICKÉ CYTOLOGICKÉ NÁLEZY V LIKVORU

Známky nespecifické aktivace v cytologickém obraze:

Příčiny – např. přítomnost cizích těles, patologické procesy hluboko v mozkovém parenchymu.

Cytologický obraz – aktivované formy lymfocytů, monocytů, často příměs neutrofilních granulocytů.

14.1. Cytologický obraz v likvoru při patologickém krvácení:

Při průniku krve do likvoru dochází k aktivaci monocytárně –fagocytárního systému se vznikem různých typů fagocytů podílejících se na postupném odstraňování krve z likvorových prostorů. Morfologicky rozlišujeme následující fagocyty: erytrofágy, siderofágy, hematoidinsiderofágy. Tyto změny nesledují vždy chronologický sled. Současně se mohou vyskytovat erytrofágy i siderofágy. Fagocytóza se objevuje již za 2-18 hodin po krvácení.

V diagnostice patologického krvácení do CNS se uplatňuje rovněž spektrofotometrie.

14.2. Cytologický obraz v likvoru u zánětlivých onemocnění:

Zvýšení počtu buněk v likvoru /pleocytóza/ neznamená automaticky infekční onemocnění a naopak ne každá infekce nervového systému způsobí pleocytózu.

Jednotlivé buněčné typy:

a. Polymorfonukleární leukocyty

Objevují se při akutní reakci mening v likvoru rychle, ale po odběru jejich počet rychle klesá.

b. Neutrofilní granulocyty

Mají segmentované jádro, objevují se u bakteriálních infekcí, mají schopnost fagocytózy. Během jednoho týdne mizí. Pokud přetrvávají déle, je nutno zvážit i jiné diferenciálně diagnostické možnosti.

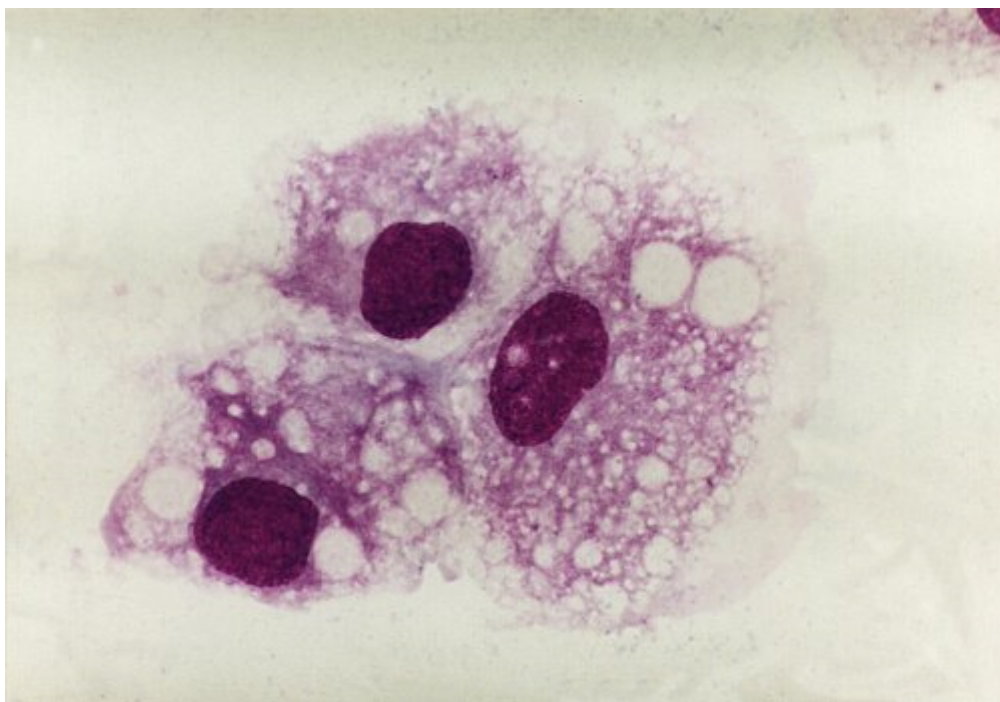
c. Eozinofilní granulocyty

Mají oranžově červená granula v cytoplazmě. Pokud jejich množství přesahuje 1% v diferenciálním cytologickém obraze, musíme pomýšlet na parazitární onemocnění nebo přítomnost cizího tělesa.

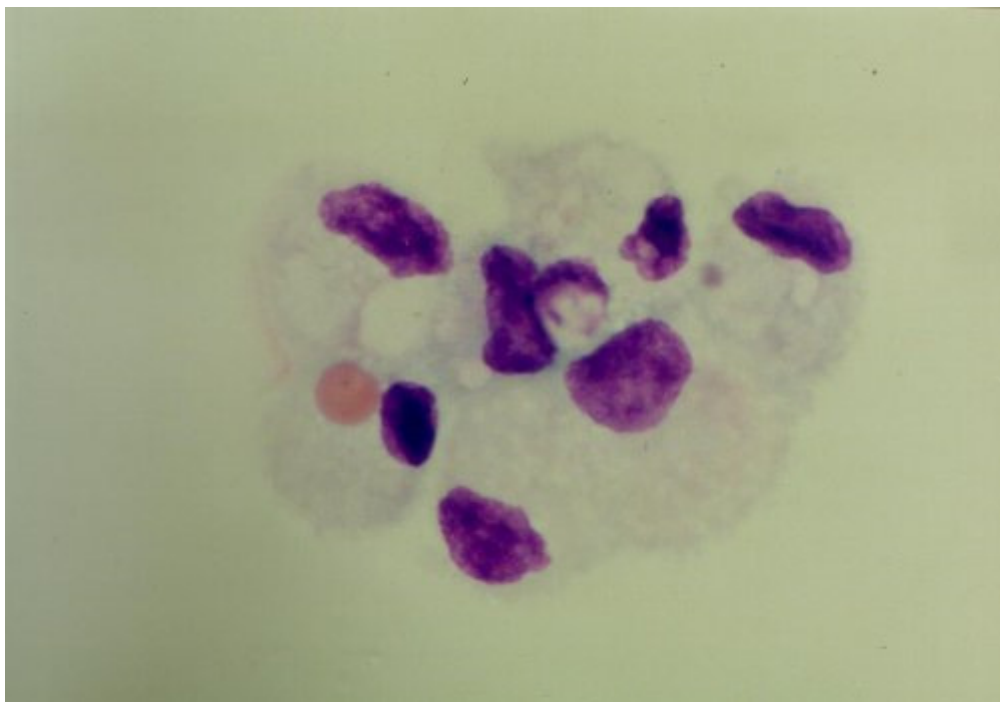
d. Makrofágy /fagocyty/

Jsou aktivované a morfologicky transformované monocyty odstraňující cizí materiál z nervové tkáně a likvoru. Podle typu fagocytovaného materiálu rozlišujeme bakteriofagocyty, leukofágy, erytrofágy, lipofágy, pigmentofágy.

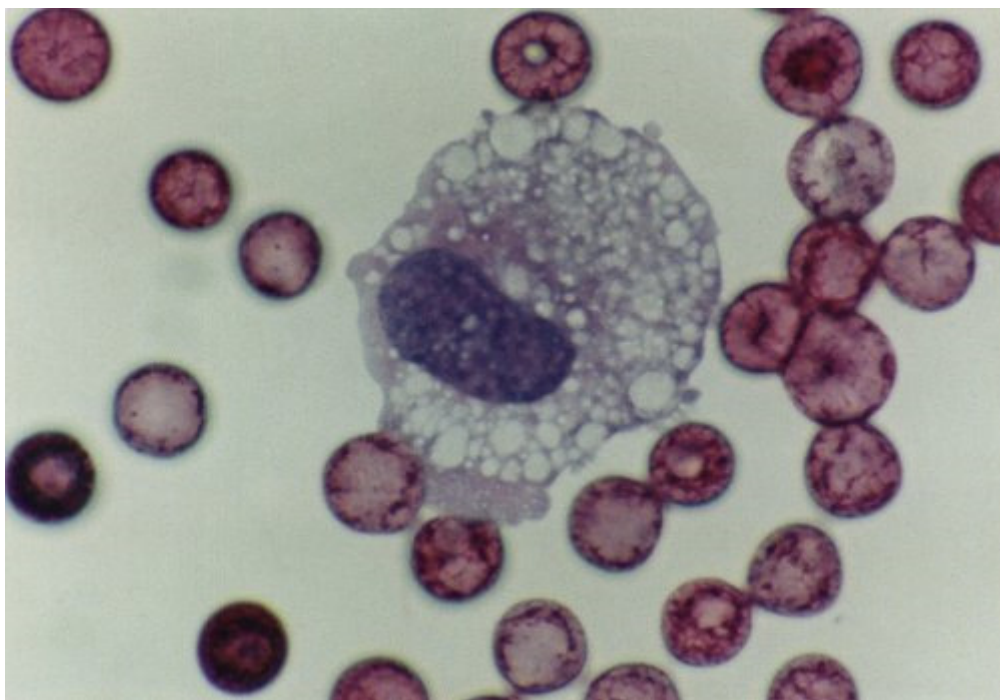
Obrázek 9: *Lipofág*



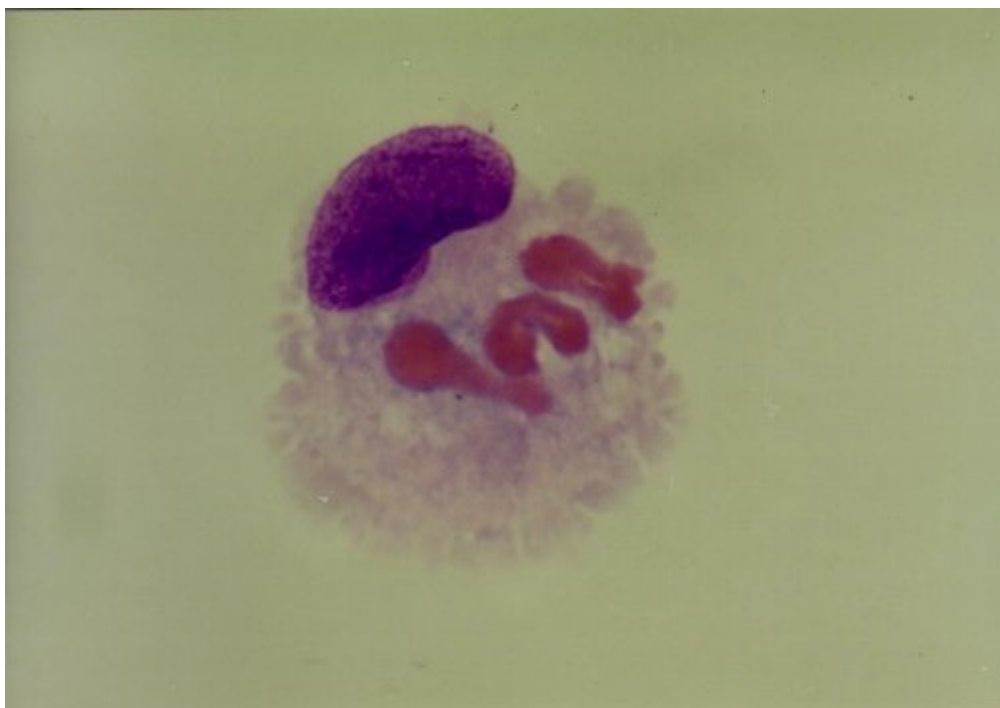
Obrázek 10: *Lipofág, fagocytosa erytrocytů*



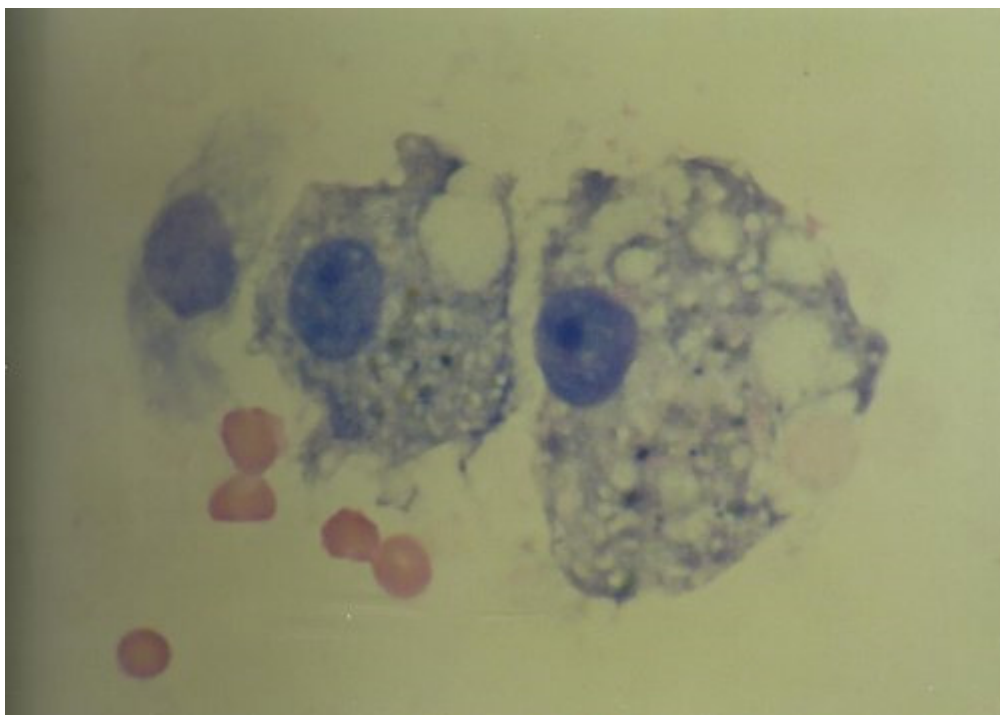
Obrázek 11: Aktivované monocyty s adherovanými erytrocyty



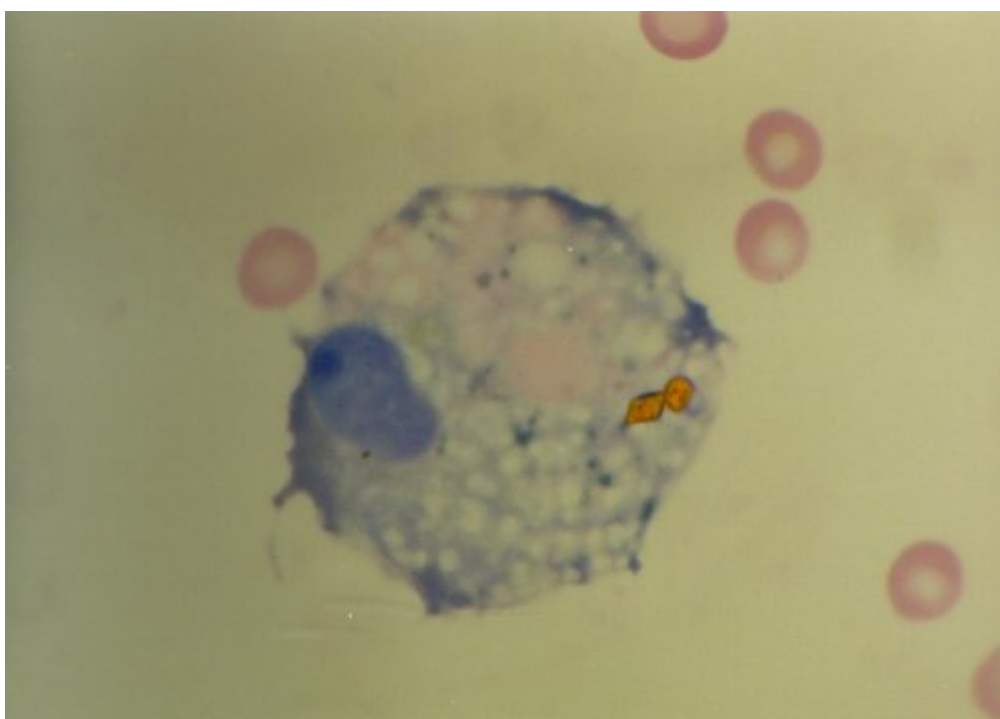
Obrázek 12: Erytrofágy



Obrázek 13: Siderofágy



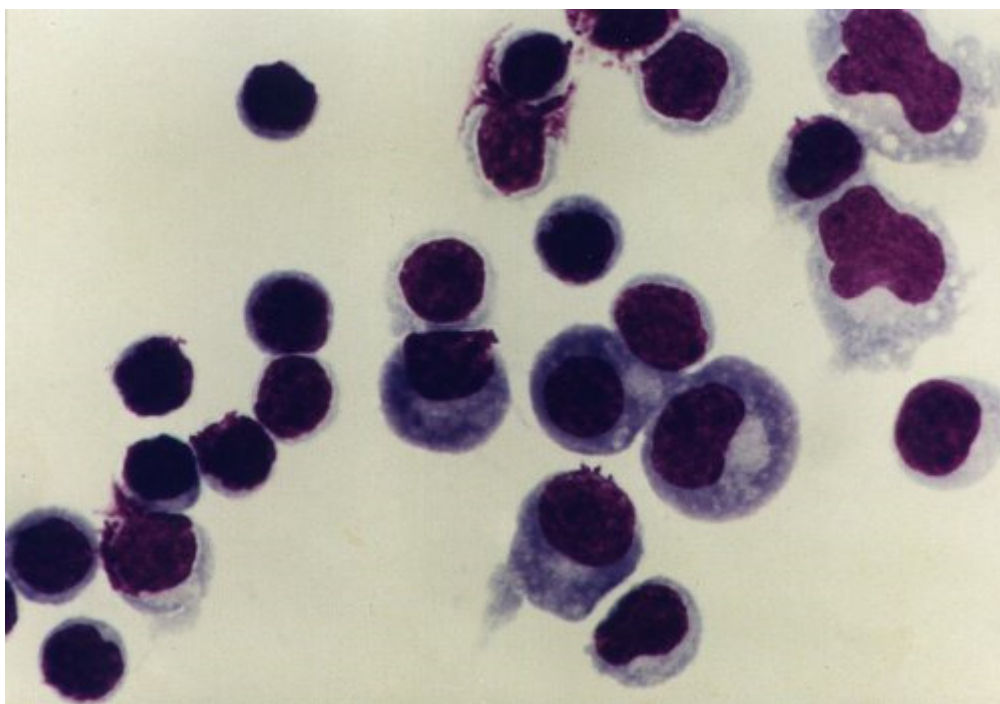
Obrázek 14: Siderofágy s krystaly hematoidinu



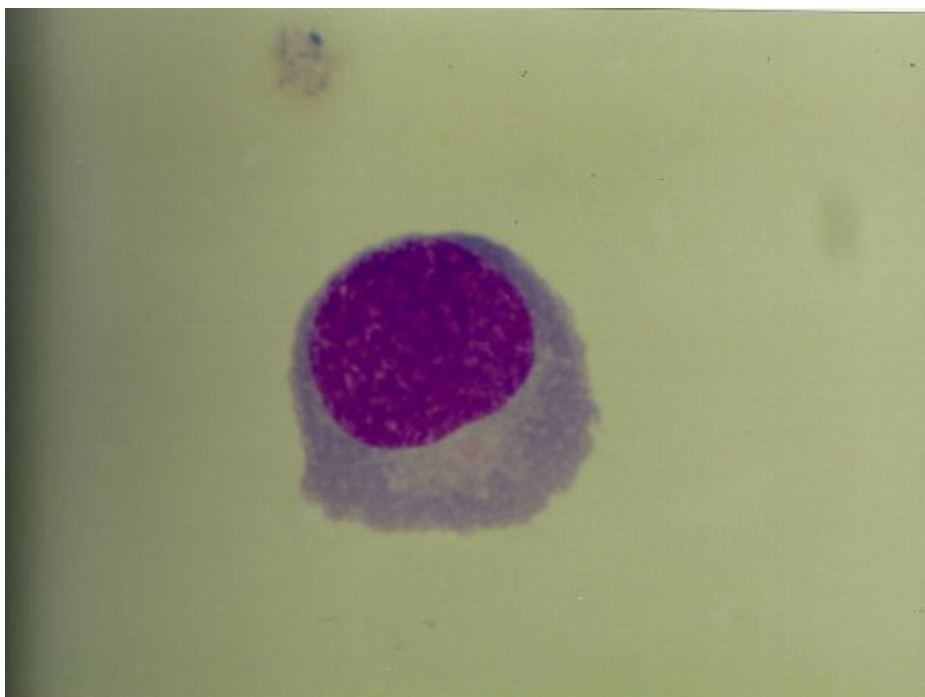
e. Plazmatické buňky

V normálním likvoru se nevyskytují. Vždy poukazují na zánětlivou reakci. Plazmatické buňky jsou posledním diferenciačním stupněm vývoje B lymfocytů produkujícím protilátky. Mají excentricky uložené jádro s kondenzovaným chromatinem, perinukleárním projasněním a bazofilní cytoplazmu.

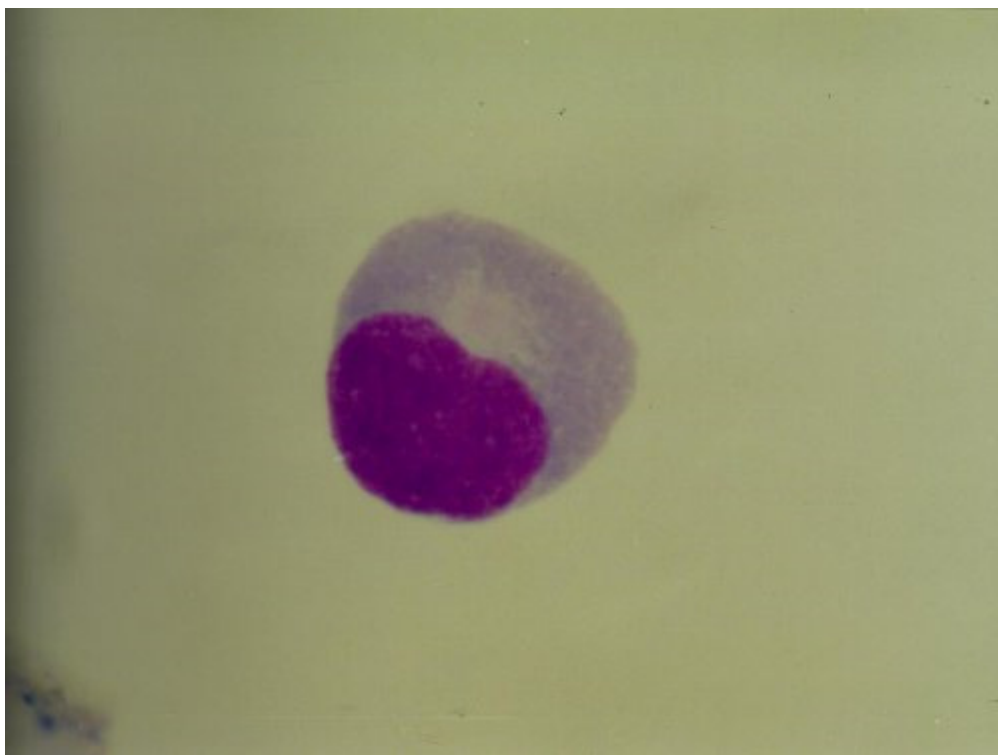
Obrázek 15: Neaktivované, aktivované lymfocyty, lymfoplasmocyty



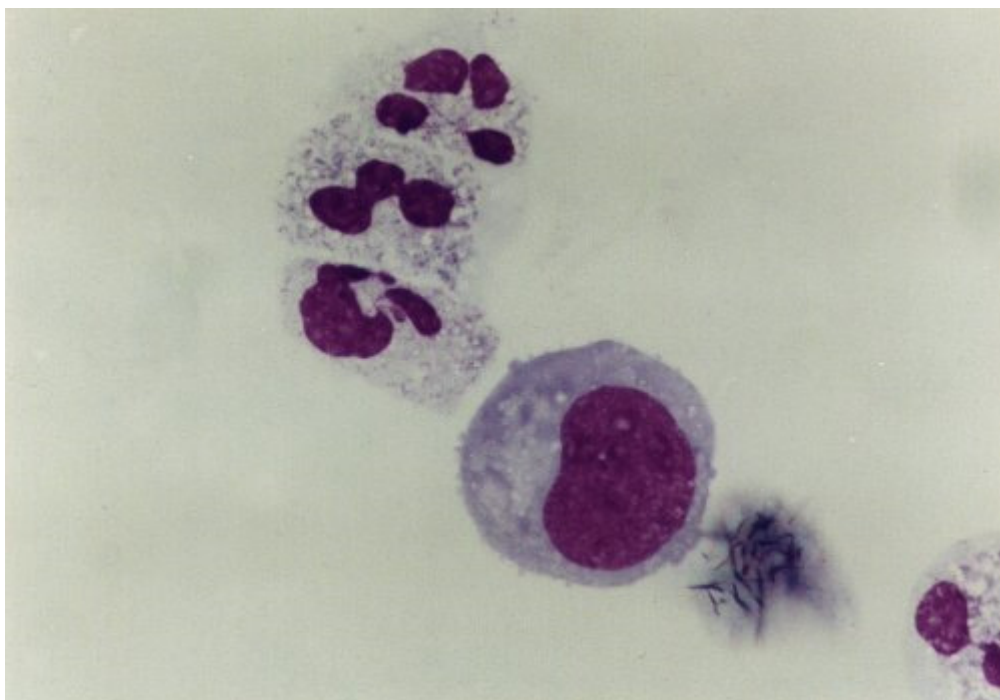
Obrázek 16: Plasmocyt



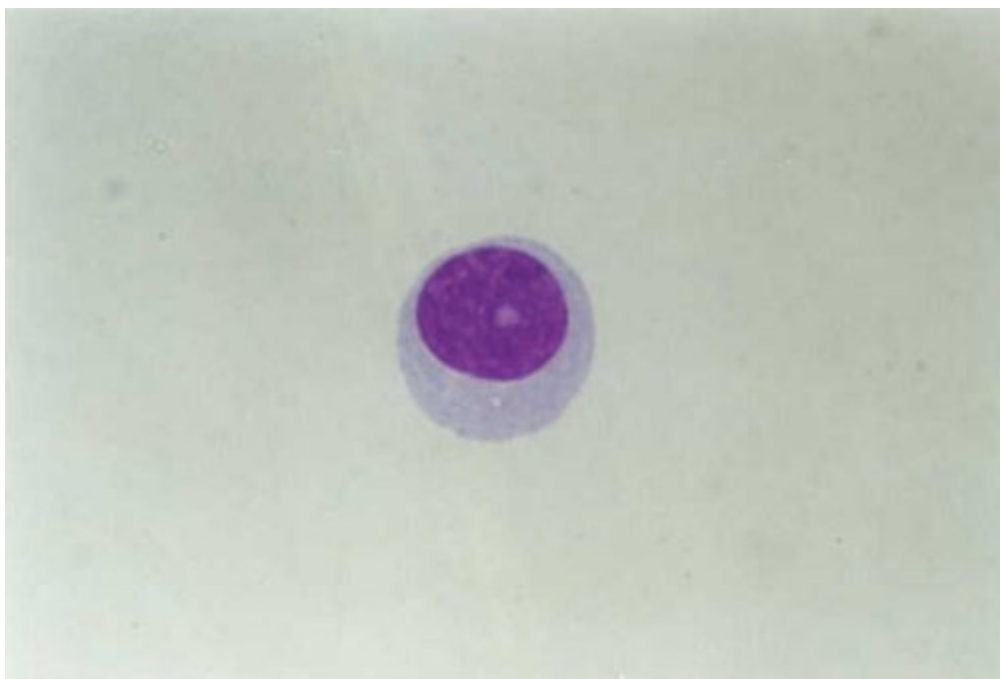
Obrázek 17: Plasmocyt



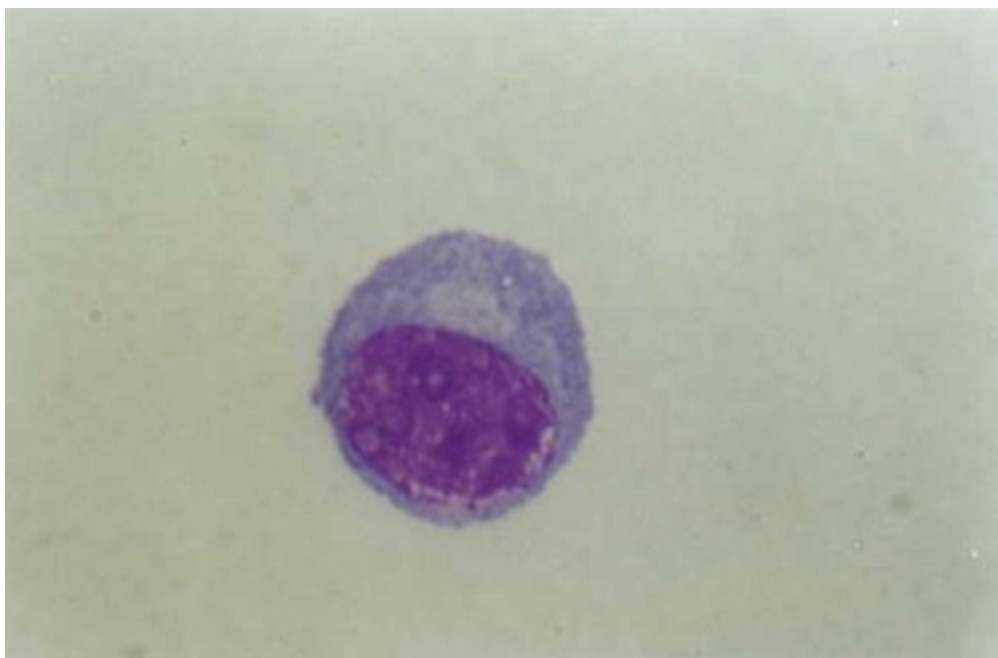
Obrázek 18: Plasmocyt, neutrofily



Obrázek 19: Aktivovaný lymfocyt s cytoplasmatickým projasněním



Obrázek 20: *Lymfoplasmocyt*



f. **Aktivované B lymfocyty**

Představují vývojový mezistupeň B lymfocytu a plazmocyty. Imunoglobuliny třídy IgG, IgA, IgM jsou prokazatelné imunocytochemicky intracytoplasmaticky a nejsou ještě sekretovány do likvoru. Pravidelně jsou přítomny s plazmocyty.

14.3. Cytologický obraz v likvoru u nádorových onemocnění:

Diagnostika nádorových buněk v likvoru patří k nejobtížnějším a je nutné při podezření na nádorové onemocnění provést další vyšetření - jako stanovení nádorových markerů, event. imunocytochemické vyšetření.

a. Cytologická kritéria malignity:

- polymorfie buněčných jader
- polychromazie
- zmnožení jadérek
- vícejadernost buněk
- zvýšený počet mitóz
- atypické mitózy
- posun v jaderně - plazmatickém poměru
- zvýšená variabilita cytopazmy s nehomogenními strukturami
- vakuolizace
- neostré ohraničení buněčných struktur

b. Primární mozkové tumory

Jejich buňky nalézáme v likvoru pouze sporadicky, častěji nacházíme buňky meduloblastomu, neuroblastomu, ependymomu a dysgerminomu. Občas mohou gliomy indukovat průvodní lymfo-monocytární zánětlivou reakci, někdy s přítomností aktivovaných B lymfocytů nebo plazmocytů.

c. Sekundární mozkové tumory

Nejčastěji metastazuje do CNS karcinom prsu, plic, ledvin, žaludku a maligní melanom. Při karcinomatóze mening je cytologie likvoru nejpřínosnější diagnostickou metodou.

d. Lymfomy a leukémie

Většina lymfomů vzniká z B lymfocytů. Primární lymfom mozku je vzácný. Sekundární lymfom se může vyskytnout ve formě solitární nebo difuzní.

15. SYNDROMOLOGICKÁ KLASIFIKACE LIKVIOROVÝCH CYTOLOGICKÝCH NÁLEZŮ

15.1. Normální nález

- lymfocyty 50-80%, monocyty 20-50%
- v obou řadách převažují klidové formy /maximálně 10-20% aktivovaných forem/
- žádné lymfoplazmocyty, ani zralé plazmatické buňky
- žádné lipofágy
- žádné segmenty

15.2. Patologická oligocytóza

Normální počet buněk, patologická celulární skladba:

a. Lymfocytární oligocytóza:

- převaha lymfocytů + zvýšené relativní zastoupení jejich aktivovaných forem
- plazmocytární formy

Hodnocení: diskrétní serózně-zánětlivé změny, přítomnost plazmocytárních forem jsou typické pro chronické neuroinfekce a roztroušenou sklerózu.

b. Monocytární oligocytóza:

- převaha buněk monocytární řady
- zvýšené relativní zastoupení aktivovaných forem této řady
- popř. přítomnost specifického substrátu fagocytózy /lipofágy, erytrofágy, pigmentofágy/

Hodnocení: nespecifická abnormita, není-li přítomen specifický substrát fagocytózy, jde někdy spíše o variantu normálního nálezu. Tento nález je nejčastější cytologickou abnormitou u polyradikuloneuritidy Guillain-Barrého, častý u vertebrogenních onemocnění, u nezánettivých onemocnění nervové soustavy. Nález lipofágů je podezřelý z destrukce nervové tkáně bohaté na lipidy, nález erytrofágů, resp. hematogenních pigmentů, prokazuje čerstvé, resp. starší krvácení do likvorových prostor.

c. Smíšená mononukleární oligocytóza:

- zároveň přítomná aktivace buněk lymfocytární i monocytární řady, aniž by známky aktivace v jedné z obou řad zřetelně převažovaly.

Hodnocení: přítomnost plazmocytárních forem vždy odráží zánětlivý proces v likvorovém kompartmentu, nejsou-li plazmocytární formy zachyceny, jde o nepřilíš specifický nález, může jít o zánětlivé i nezánettivé onemocnění nervového systému.

d. Smíšená oligocytóza /mononukleáry + segmenty/:

- významné zastoupení granulocytů /cca 20 – 50 %, nejčastěji neutrofilních/

Hodnocení: ne zcela typická „reakce akutní fáze“. Jde o výraznou patologii, která může signalizovat incipientní hnisavou i nehnisavou neuroinfekci nervového systému, přítomnost eozinofilů může značit alergickou reakci, ale také infekční komplikaci po invazivních neurochirurgických výkonech.

e. Granulocytární oligocytóza:

- zřetelná převaha granulocytů /nejčastěji neutrofilních/

Hodnocení: incipinetní hnisavá či nehnisavá neuroinfekce, „rekace akutní fáze“, alergická reakce, infekční komplikace po neurochirurgických invazivních výkonech. Nejčastěji ale neuroinfekce.

f. Tumorózní oligocytóza:

- přítomnost nádorových buněk v preparátu

15.3. Pleocytóza

Zvýšený počet elementů:

a. Lymfocytární pleocytóza:

- počet elementů velmi různý /desítky až stovky/
- převaha lymfocytů
- zvýšené zastoupení jejich aktivovaných forem
- zpravidla přítomny plazmocytární formy

Hodnocení: serózně-zánětlivé změny.

b. Monocytární pleocytóza:

- počet elementů většinou jen mírně zvýšen
 - převaha monocytárních buněk
 - zvýšené zastoupení jejich aktivovaných forem
 - někdy přítomnost specifického substrátu fagocytózy
-

Hodnocení: etiologicky nespecifická „reaktivní“ abnormita – např. ischemie CNS, polyradikuloneuritida Guillana-Barrého, terminální fáze neuroinfekcí.

c. Smíšená mononukleární pleocytóza:

- zmnožení buněk lymfocytární i monocytární řady nebo zvýšené zastoupení aktivovaných forem v obou řadách bez jednoznačné převahy jedné z nich
- přítomny aktivované formy obou řad
- přítomnost specifického substrátu fagocytózy

Hodnocení: serózně-zánětlivé změny, je-li však počet elementů jen hraničně zvýšen, jde o nepříliš specifický nález, může jít o zánětlivé i nezánětlivé onemocnění nervového systému.

d. Smíšená pleocytóza /tj. mononukleáry + granulocyty/:

- počet elementů je velmi různý /hraniční až k tisícům/
- signifikantní zastoupení granulocytů v preparátu /cca 10-50%/
- přítomny známky aktivace v lymfocytární nebo monocytární řadě

Hodnocení: většinou zánětlivé onemocnění CNS, vyšší počet elementů /stovky/ bývá u počínajících neuroinfekcí, ale také v proliferativní fázi neuroinfekcí hnisavých. Je-li počet elementů jen hraničně zvýšen, může jít i o reaktivní abnormitu.

e. Granulocytární pleocytóza:

- počet elementů výrazně zvýšen /až desetitisíce/
-

- vzácněji jen mírně zvýšen počet elementů, prakticky vždy neutrofilů, výjimečně eozinofilů

Hodnocení: charakteristický nálezn pro hnisavé neuroinfekce. Je-li pleocytóza jen mírného stupně, může jít o incipientní zánět nehnisavý, výjimečně reaktivní abnormitu. Přítomnost četnějších eozinofilů může znamenat alergickou reakci i neuroinfekci.

f. Tumorózní pleocytóza:

- přítomnost nádorových buněk v preparátu

(1,2,3,4,40,39)

16. BETA2-MIKROGLOBULIN

Beta2-mikroglobulin byl poprvé izolován v r. 1968 Beggardem a Bearnem z moče pacientů s onemocněním proximálního tubulu. Poté byla studována jeho struktura, metabolismus a jeho význam v různých medicínských oborech.

Beta2-mikroglobulin je nízkomolekulární protein, vysoce stálý během evoluce, jehož syntéza je kontrolována z lokusů na 6. chromozómu. Má molekulovou hmotnost 11.800 Daltonů. Je tvořený 99 aminokyselinami, jejichž sekvence je známa. Má vnitřní disulfidickou vazbu a vytváří tím smyčku. /viz. obr.21/

Nápadná je podobnost jeho primární i sekundární struktury s konstantní doménou IgG, zvláště doménou CH3 /více než ¼ poloh je identická a také beta2-mikroglobulin zaujímá konformaci beta listu, typickou pro imunoglobulinovou strukturu/, což vede k předpokladu, že se oba, beta2-mikroglobulin i IgG, vyvinuly ze stejného ancestrálního genu.

Beta2-mikroglobulin tvoří lehký nevariabilní řetězec histokompatibilních antigenů /HLA I. třídy/, proti nimž je zaměřena imunologická intervence po transplantaci. HLA jsou s různou intenzitou syntetizovány všemi živými jadernými buňkami těla a jsou rozmístěny na jejich buněčném povrchu, nejhustěji na lymfocytech a makrofázích. Nenachází se na erythrocytech. Ve srovnání s lymfocyty je molekul HLA například 5x méně na jaterních buňkách, 200x méně na buňkách kosterních svalů a 1000 x méně na buňkách mozkových.

Beta2-mikroglobulin je k těžkému řetězci HLA nekovalentně vázán, následkem metabolismu a degradace HLA je od těžkých řetězců disociován, a poté se objevuje ve volné formě v extracelulární tekutině a ve všech tělních tekutinách – sérum, moč, ascites, pleurální tekutina, synoviální tekutina, sliny, likvor, zatímco těžký HLA řetězec je rychle degradován.

Tvorba beta2-mikroglobulinu a jeho uvolňování do těchto tekutin jsou u zdravých lidí konstantní a velmi nízké – 0,13 mg/hod/kg hmotnosti.

V séru se zvyšuje hladina beta2-mikroglobulinu u různých stavů – u nádorů /mnohočetný myelom, non – Hodginský lymfom, Hodgikova choroba, chronická lymfatická leukémie/, zánětů, imunologických onemocnění, selhávání ledvin – kdy dochází ke snížení katabolismu beta2-mikroglobulinu, neboť beta2-mikroglobulin je z 99% vylučován ledvinami. Komplexní vzorec korelace močového kreatininu, albuminu a beta 2-mikroglobulinu je sledován jako vysoce specifický mechanismus renální filtrace. Vyšetření v moči představuje menší zátěž / neinvazivní odběr na rozdíl od odběru krve, možnost opakovaných odběrů../vede k časně detekci, prognoze, a sledování odpovědi na léčbu.(16)

Koncentrace beta2-mikroglobulinu v séru je ovlivňována velkým množstvím faktorů, a proto její stanovení nemá velký diagnostický význam.

Zvýšení hladiny beta2-mikroglobulinu v likvoru odpovídá lokální produkci a je připisováno především aktivaci imunitního systému, produkci anomálními buňkami a dále uvolňování při tkáňové destrukci.

(5,6,17,33)

Obrázek 21 – molekula beta2-mikroglobulinu

636

Schardijn and Statius van Eps



Molecular Stokes radius 16A
Sedimentation coefficient $S_{20,w} = 1.6$
Estimated molecular weight: 11 800 dalton

Amino-acid residues: 100
Carbohydrates: 0
pI: 5.7

Fig. 1. Primary structure and physicochemical characteristics of β_2 -microglobulin. From Phadecoc Diagnostic Communications 6; 4: 1979 (Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden).

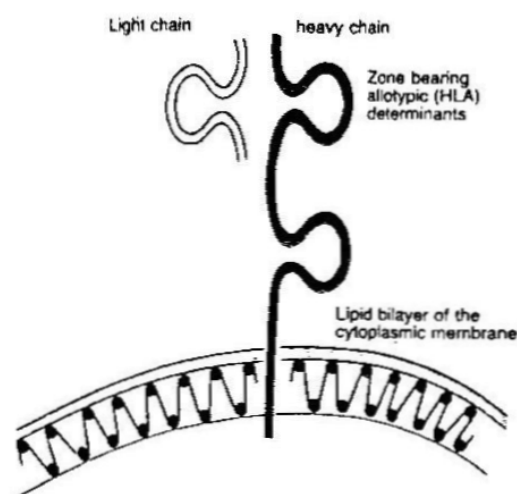


Fig. 2. A schematic representation of the HLA complex (class I) with the heavy chain (right side) penetrating the cytoplasmic membrane and the light chain being β_2 -microglobulin attached non-covalently to the heavy chain. From Phadecoc Diagnostic Communications 6; 9: 1979 (Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden).

Indikace stanovení hladiny beta2-mikroglobulinu:

- monitorování a sledování úspěšnosti léčby lymfomu, plasmocytomu, non - Hodginského lymfomu
- stanovení glomerulární filtrace – především u dětí
- diagnóza a monitoring u tubulo-intersticiálního poškození ledvin
- podezření na dialýze – závislé amyloidóze
- stanovení renálních funkcí po transplantaci ledvin a časná detekce onemocnění cytomegalovirem
- zjištění nepřijetí transplantátu po transplantaci kostní dřeně

- monitoring a progresu onemocnění u pacientů HIV pozitivních (6,24,44)

Stanovení hladiny beta2-mikroglobulinu současně s hladinou ferritinu v mozkomíšním moku může být užíváno jako marker pro diferenciální diagnózu meningitid a stanovení odpovědi na léčbu.

Byla publikována studie 122 pacientů – rozdělených podle známé etiologie obtíží do tří skupin: bakteriální meningitidy, virové meningitidy a skupina nemeningitických postižení.

Hladina beta2-mikroglobulinu a ferritinu byla stanovena metodou latexové fotometrické imunoessaye /LPIA/.

Hlavní kritéria pro diagnózu meningitidy byla horečka, cefalea, zvracení a pleocytosa v mozkomíšním moku.

První skupina – bakteriální meningitida s etiologickým agens H. influenzae a Streptococcus sk. B. Byla intravenózně podávána antibiotika.

Ve druhé skupině virových meningitid bylo etiologické agens – virus zarděnek, spalniček, echo virus, herpes zoster, enterovirus – stanovení bylo potvrzeno serologickým vyšetřením.

Třetí skupina byli pacienti s normálním mozkomíšním mokem. Byly zde pacienti s nejrůznějšími onemocněními – jako např. epilepsie, leukemie ve fázi remise, febrilní křeče, pneumonie, infekce močových cest, ...

Studie ukázala, že hladina výše jmenovaných proteinů ve skupině nemeningitických postižení závisí na věku. Vzorky od pacientů starších 5 měsíců vykazovaly vyšší hladinu proteinů než u pacientů mladších než 6 měsíců. Hladina beta2-mikroglobulinu byla výrazně zvýšena u pacientů s virovou meningitidou než u pacientů s nemeningitickým postižením CNS.

Hladina ferritinu byla vyšší u pacientů s bakteriální meningitidou než u pacientů s virovou meningitidou a závisela na odpovědi na antibiotickou léčbu. Tyto výsledky jsou signifikantní pro pacienty starší než šest měsíců.

Ferritin a beta2-mikroglobulin mohou být užívány jako diagnostická kritéria v akutní fázi meningitid a určování odpovědi na léčbu antibiotiky.

Studie ukázala, že je indikováno rychlé stanovení beta2-mikroglobulinu a ferritinu v mozkomíšním moku jako diagnostické kritérium pro akutní fázi meningitidy a stanovení odpovědi léčby meningitidy. Koncentrace beta2-mikroglobulinu a ferritinu je závislá na věku – v závislosti na propustnosti hematoencefalické bariéry. A hladina beta2-mikroglobulinu a ferritinu koreluje s hladinou celkové bílkoviny.

Koncentrace beta2-mikroglobulinu a ferritinu byla signifikantně zvýšena u pacientů s virovou meningitidou. Koncentrace ferritinu byla signifikantně zvýšena u pacientů s bakteriální meningitidou než u virových meningitid.

(24,48,49,50)

Nízkomolekulární proteiny / interleukin-6,tumor nekrotizující faktor alfa,beta 2-mikroglobulin/ mají opodstatnění při sledování glomerulární filtrace, při studování vztahů normální funkce ledvin / 18 ti měsíční srovnávací studie zdravých a pacientů s chronickou renální insuficiencí/.

(36,16)

U novorozenců se symptomatickou infekcí cytomegalovirem je vysoká hladina beta2-mikroglobulinu v mozkomíšním moku a koreluje s neurologickými nálezy na zobrazovacích vyšetřeních /CT, MRI, SONO/.

Byla vyšetřována skupina 23 novorozenců se symptomatickou vrozenou infekcí CMV. Klinické postižení bylo mikrocefalie, hepatosplenomegalie, ikterus. Provedena lumbální punkce, kraniální sonografie, CT, MRI.

SONO ukázalo periventrikulární kalcifikace, dilatace mozkových komor, periventrikulární cysty.

CT vyšetření – periventrikulární kalcifikace, subkortikální, kortikální, cerebelární kalcifikace. Rozšíření mozkových komor.

MRI – periventrikulární kalcifikace, postižení nucleus caudatus, pachygyrie, polymikrogyrie.

Nálezy v likvoru – pleocytosa, zvýšená hladina celkové bílkoviny, přítomnost erytrocytů, signifikantní zvýšení beta2-mikroglobulinu proti kontrolní skupině.

Nebyla nalezena korelace mezi výsledkem vyšetření zobrazovacími metodami a hladinou proteinů v likvoru, ale výrazná pozitivní korelace mezi hladinou beta2-mikroglobulinu a pozitivním nálezem zobrazovacími metodami. Podle této studie se zdá, že vysoké hodnoty beta2-mikroglobulinu nejsou závislé na poruše hematolikvorové bariéry, data naopak odpovídají intrathekální produkci beta2-mikroglobulinu. Hlavní podíl na zvýšení beta2-mikroglobulinu má zřejmě gliální proliferace. Beta2-mikroglobulin je přítomen na povrchu gliálních buněk, které ho in vitro produkují.

(8,9,13,22,,47,49)

Antibakteriální protein izolovaný z lidské plodové vody byl shledán totožným a beta2-mikroglobulinem. Studie prokázala, že je vytvářen amniotickými buňkami, které jsou vystaveny patogenům.

Antibakteriální aktivita byla proti *L. monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. Zvýšení hladiny beta2 –mikroglobulinu bylo zjištěno v plodové vodě, u dospělých a ve fetálním seru při vystavení těmto patogenům / plodová voda byla odebírána těhotným ženám ve třetím trimestru gravidity (31)

Velký zájem představuje studium markerů v mozkomíšním moku při HIV–1 pozitivní infekci v asymptomatickém stadiu. Nejdříve je nalezen HIV–1 v mozku /v raných stádiích/, později se stává CNS terčem virů, a konečně vede HIV–1 infekce k AIDS demenci. Jedná se o devastující neurologickou komplikaci, která vede k poruše kognice, chování a motoriky během týdnů až měsíců. V retrospektivní studii bylo demonstrováno, že prevencí demence je podávání zidovudinu.

V této studii byly sledovány změny v mozkomíšním moku před podáním a po podávání léku. Všichni pacienti byli neurologicky asymptomatictí. Byly sledovány změny během léčby – v hladině beta2-mikroglobulinu monocytního chemotaktického proteinu /MCP–1/ a rozpustného tumor nekrotizujícího faktoru alfa /sTNRFs/.

Odběry byly provedeny před léčbou, během léčby a po skončení. Podáváno bylo 3x 200 mg zidovudinu, 2x denně 150 mg lamivudinu nebo 2x denně 40 mg stavudinu a 2x denně 150 mg lamivudinu.

Hladiny beta2-mikroglobulinu v séru a likvoru výrazně klesly po 12 týdnech léčby.

Hladina beta2-mikroglobulinu korelovala s HIV-1 RNA pozitivitou a mezi hladinou beta2-mikroglobulinu a počtem buněk v likvoru, rovněž byla nalezena korelace mezi hladinou beta2-mikroglobulinu v likvoru a v séru při vstupním vyšetření, ne již v kontrolním vyšetření po 12 týdnech léčby.

Hladina MCP–1 v séru a v likvoru byla rozdílná u kontrolní skupiny, ale v průběhu léčby se výrazněji neměnila.

Koncentrace sTNRFs byla zvýšena před léčbou proti kontrolní skupině, ale hladina se nezměnila po léčbě.

V této studii tedy u neurologicky asymptomatických nemocných HIV-1 pacientů hladiny beta2-mikroglobulinu v likvoru byly výrazně zvýšené proti kontrolní skupině. V prospektivní studii pacientů se zvýšenou hladinou beta2-mikroglobulinu v likvoru bylo vyšší riziko rozvoje AIDS demence. Pokles koncentrace beta2-mikroglobulinu byl po léčbě zidovudinem nebo lamivudinem.

(10,11,23)

Další studie dokazuje význam podávání antiretrovirálních léků, inhibitorů reverzní transkriptázy.

HIV-1 se nachází v likvoru ve většině HIV pozitivních pacientů ve všech stádiích onemocnění, včetně primární infekce. Odráží aktivitu, postup infekce a intretrekální buněčně navozenou odpověď zvýšením hladiny koncentrací neopterinu a beta2-mikroglobulinu. V době, kdy se objeví porušení hematolikorové bariéry, nastává již kritický bod v rozvoji ADC /AIDS dementia complex/.(15)

Studie hodnotí 8 pacientů /1 s neurologickými komplikacemi, 7 neurologicky bezpříznakových/ léčených nelfinavirem, saquinavirem a dále kombinací zidovudinem a lamivudinem, zidovudinem a didanosinem. V opakovaných lumbálních punkcích byly stanoveny hladiny beta2-mikroglobulinu a neopterinu. Tyto hladiny klesly v likvoru i v plazmě během léčby a po léčbě.

Velmi významná studie, která se zabývá ADC a jeho léčbou, proběhla v r. 2007 za účasti 13 klinik v Austrálii, Kanadě a Velké Británii.

ADC /AIDS dementia complex/ byl poprvé sledován již v počátcích vzniku HIV epidemie. Pacienti s tímto postižením trpí demencí, poruchami chování, poruchami chůze a rovnováhy. Nyní se objevuje méně

v lokalitách, kde se pacienti podrobují léčbě vysoce aktivní retrovirální terapií /kombinací léků, které postihují virus v různých etapách jeho životního cyklu/. Dosud není přesně určená nejlepší kombinace léčby. Po nějakou dobu ještě potrvá její stanovení, včetně kombinace procházející přes hematoencefalickou bariéru.

ADC je postižení, které se objevuje asi u 20% pacientů před užíváním retrovirální léčby.

(14,19,20)

Zidovudin snížil tento výskyt na méně než polovinu. Nejlepším ukazatelem léčby zidovudinem, stavudinem, lamivudinem, idinavirem je stanovení hladiny beta2-mikroglobulinu a quinolinové kyseliny v likvoru.

Antiretrovirální léčba, která je úspěšná při léčbě ADC, musí splňovat požadavky antivirální aktivity, schopnosti procházet do mozku v odpovídajících koncentracích, aktivovat mikrogliaální a makrogliaální systém. Ve studii byla podávána v několika skupinách pacientům po dobu 12 týdnů různá kombinace výše uvedených léků. Sledován byl likvor a hladiny beta2-mikroglobulinu a kyseliny quinolinové, jejich hladina poklesla proti skupině HIV pozitivních neléčených pacientů.

Beta2-mikroglobulin se jeví jako důležitý ukazatel odrážející změny v mozku při postižení HIV infekcí a zároveň odrážející úspěšnost léčby.

(11,51,26,43)

Neuronální poškození, ztráta dendritů a mozková atrofie jsou komplikacemi HIV infekce. Aktivované mozkové makrofágy a mikroglie mohou uvolňovat quinolinovou kyselinu, neurotoxin a NMDA /N-methyl-D-aspartát/ agonistický receptor. Byla zjištěna nezávislost mezi zmenšeným objemem striata a limbického systému a kyseliny quinolinové a beta2-

mikroglobulinu. Hladina beta2-mikroglobulinu a quinolinové kyseliny nezávisí na ztrátách objemu – v jakékoli oblasti.

(33,43)

Beta2-mikroglobulin je markerem mikrogliaální aktivity a nesouvisí s glutamátovými receptory, jejichž hladina je závislá na excitotoxicitě a objemových ztrátách.

(27,28,33,45)

Beta2-mikroglobulin spolu s neopterinem, receptorem pro interleukin-2 jsou důležitými markery pro stanovení buněčné imunitní odpovědi po mozkových traumatických lézích. Mechanické poškození mozku, stejně jako zánět, aktivují cytokiny.

Neopterin je produkován makrofágy po stimulaci a aktivaci gama-interferonem. Jeho zvýšená hladina svědčí o aktivaci makrofágů, nachází se v plazmě postižených pacientů.

Beta2-mikroglobulin je součástí MHC-I komplexu. Zvýšená hladina odráží aktivaci buněčného imunitního systému.

IL-2 receptory na T-lymfocytech a monocytech/makrofázích je několik glykoproteinů, zvyšujících se u pacientů s autoimunitním postižením, hematologickým postižením, během transplantací. U pacientů s izolovaným traumatickým poškozením mozku byla sledována hladina výše uvedených markerů.

Sledování probíhalo po dobu 21 dní současně v séru a likvoru.

Byla patrná rozličná kinetika neopterinu a beta2-mikroglobulinu. Neopterin i beta2-mikroglobulin stoupaly během prvního a druhého týdne, ale hladina beta2-mikroglobulinu se zvyšovala spíše v séru. Její zvýšení v likvoru na rozdíl od neopterinu nebyly tak patrné.

IL-2 receptory stoupaly v séru i likvoru.

Beta2-mikroglobulin, jako poněkud nespecifický protein, nepodává tak důležitou informaci o průběhu onemocnění po úrazech mozkových jako neopterin či receptor IL-2.

(15,17,,19,20,21,25,27,33,35,37,39,40,44,46,51)

Další výzkumy přicházejí u pacientů se sarkoidozou. Sarkoidoza je multisystémové onemocnění, nejčastěji postihující plíce, oči a kůži. Postižení páteře je vzácnější, proto je méně známá jeho diagnóza a léčba. Nejčastější výskyt onemocnění je ve věkové skupině kolem 40 roků, asi 17% postižených jeví i příznaky postižení CNS. Provedená autopsie zjišťuje subklinické postižení CNS v 50% případů. Poškození páteře se objevuje nejčastěji po plicních příznacích. Klinicky se projevuje paraparesou, kvadruparesou, autonomní dyserfelexií, radikulárními příznaky, kaudálními příznaky. Diagnóza se stanoví MRI vyšetřením, ale hlavně analýzou mozkomíšního moku. Nálezem je lymfocytární pleiocytoza, elevace hladiny celkové bílkoviny, v 75% případů je zvýšené hladiny beta2-mikroglobulinu. Hladiny ale nekorelují s hladinou v séru.

(42,30,12,32)

Diagnóza většiny degenerativních onemocnění CNS, jako Alzheimerova demence, Parkinsonova choroba, demence s Lewyho tělísky, se opírá o klinická kritéria a laboratorní vyšetření, která jsou značně limitovaná.

Výzkum ve stanovení, vyšetřování specifických proteinů, metabolitů apod. je tedy velmi důležitým úkolem.

Zejména stanovení diagnózy těchto onemocnění v počátečních stádiích je velmi složité, ale důležité.

Hladina markerů se stanovuje v séru a v likvoru. Zvláště některé proteiny, jako např. alfa 1–antitrypsin, beta2-mikroglobulin, jsou důležité při vyšetřeních např. u Alzheimerovy demence.

Zde bývá vyšetřován apolipoprotein A1, E, J, beta–trace protein kininogen.

(7,,34,35,39,38,52)

Hladiny beta2-mikroglobulinu, apolipoproteinu E,apolipoproteinu J,prekursoru transferitinu,proapolipoproteinu,alfa1-antitrypsinu byly zvýšeny u pacientů s meningeomem proti pacientům s nádorem mimo CNS lokalitu.(29)

17. CÍL PRÁCE

Vyšetřování beta2-mikroglobulinu v séru a likvoru v poslední době patří k základnímu vyšetření.

Přesto v podvědomí lékařské veřejnosti není odůvodnění tohoto vyšetření. Mnoho lékařů neví, proč toto vyšetření indikovat, co je vlastně beta2-mikroglobulin, k čemu slouží a podobně.

Současně panuje mezi lékaři velký rozpor. Část se domnívá, že výtěžnost vyšetření hladiny beta2-mikroglobulinu není téměř žádná, že se jedná o nespecifický protein a pouze konstatujeme – hladina vyšší či nižší. Druhá

skupina je přesvědčena o důležitosti tohoto proteinu a hlavně o výtěžnosti jeho vyšetření pro diagnózu a sledování adekvátní léčby u pacienta.

Cílem této práce je podpořit druhou skupinu – ozřejmit, ať už teoreticky /v předchozí části práce důležitost tohoto proteinu, dokumentovanou z nejrůznějších publikací/, tak i prakticky /na rozsáhlém souboru pacientů/ důležitost beta2-mikroglobulinu, výtěžnost pro stanovení diagnózy, adekvátní léčby, ...

Cílové otázky:

1. Je hodnota hladiny beta2-mikroglobulinu závislá na určitém onemocnění, určité nosologické jednotce?
2. Je u určitých skupin onemocnění řádově vyšší hladina tohoto proteinu než u jiných skupin?
3. Je závislá hladina beta2-mikroglobulinu na pohlaví?
4. Je závislost mezi hladinou tohoto proteinu a věkovou hranicí? Souvisí tedy jeho hladina s propustností hematoencefalické bariéry a tím s vyzářností CNS?

Přínos vyšetřování beta2-mikroglobulinu:

- poměrně jednoduchá metoda nepříliš finančně náročná
 - rychlá orientace pro základní hodnocení /serozní onemocnění CNS, TU, bakteriální meningitidy, degenerativní onemocnění/
 - dostupnost tohoto vyšetření v laboratořích
 - opakovaným vyšetřením sledování úspěšnosti léčby
 - jasná výpovědní hodnota bez složitého přepočítávání či dalšího statistického zpracování /bez nutnosti užívání speciálních programů/
-

- velký přínos pro výzkumné účely – zavádění nových léků – zejména u HIV pozitivních pacientů – sledování účinnosti léčby porovnávací studie
- spolu s dalšími proteiny /ferritin/ přínos pro diagnostiku degenerativních onemocnění

18. SOUBOR PACIENTŮ A METODIKA

V biochemické laboratoři Na Homolce bylo v období od r. 1999 do r. 2006 vyšetřeno 26 378 vzorků likvoru od pacientů z pracovišť v prakticky celé ČR odesílajících materiál k vyšetření na toto pracoviště.

Jednalo se o nejrůznější pracovní diagnózy: meningitidy – bakteriální, virové, demyelinizační onemocnění, tumory, závratě, polyneuropatie, polyradikuloneuritidy. Jako kontrolní skupinu je možno považovat pacienty s diagnózou vertebrogenního onemocnění, u kterých byly fyziologické nálezy, což nemusí být pravidlem.

Při těchto výzkumech je velmi obtížné stanovit skupinu „zdravých“ pacientů. U zdravého člověka neprovádíme odběr mozkomíšního moku vzhledem k náročnosti tohoto vyšetření. Za skupinu fyziologických nálezů tedy považujeme skupinu pacientů, u kterých bylo provedeno vyšetření při podezření na nějaké onemocnění – to se nepotvrdilo, nález v moku byl ve fyziologickém rozmezí, či u pacientů, u kterých bylo prováděno perimyleografické vyšetření a likvor byl odeslán k vyšetření do laboratoře. Při tomto vyšetření ale musí být nález fyziologický. U některých nemocných je zvýšená hladina celkové bílkoviny, event. patologický cytologický nález – tyto vzorky už nemohou sloužit jako „normály“, ale jsou součástí podskupiny ostatní nosologické jednotky.

Charakteristika souboru:

- Sledované období: 1999- 2006
- Počet vzorků: 26 378
- Věk: 3 roky – 86 let
- Lokalita: ČR
- Materiál: mozkomíšní mok

a. Stanovení diagnózy:

Pracovní diagnóza – na žádance na základě klinických příznaků a pomocných vyšetření od doporučujícího lékaře.

b. Potvrzení diagnózy:

Na základě vyšetření mozkomíšního moku, imunoelektroforeza – demyelinizační onemocnění, stanovení protilátek – lymfická borelioza, morfologické vyšetření – tumory.

c. Metodika:

Základní biochemické vyšetření likvoru. Hladina beta2-mikroglobulinu byla vyšetřována metodou imuno-turbidimetrie, tj. sledování nárůstu zákalu při vazbě protilátky na beta2-mikroglobulin. Sledování na analyzátoru SYNCHRON LX 20 firmy Beckman. Chemikálie – od firmy Bio-Vendor ČR.

d. Statistika:

Statistické zpracování daného souboru spočívalo ve vypočítání průměrných hodnot /součtu jednotlivých hodnot dělených počtem vzorků/ a ve vypočítání směrodatné odchylky.

Směrodatná odchylka, značená řeckým písmenem σ , se obvykle definuje jako odmocnina z rozptylu náhodné veličiny X , tzn.

$$\sigma = \sqrt{D(X)} = \sqrt{\text{var}(X)},$$

kde $D(X)$ označuje rozptyl náhodné veličiny X . Směrodatnou odchylku lze vypočítat pomocí střední hodnoty $E(X)$ a případně i $E(X^2)$.

$$\sigma = \sqrt{E((X - E(X))^2)} = \sqrt{E(X^2) - (E(X))^2}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} = \sqrt{\left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i^2 \right) - \bar{x}^2}$$

Směrodatná odchylka vyjadřuje, jak se hodnoty liší od průměrné hodnoty (střední hodnoty). Zhruba řečeno vypovídá o tom, jak moc se od sebe navzájem liší typické případy v souboru zkoumaných čísel. Je-li malá, jsou si prvky souboru většinou navzájem podobné, a naopak velká směrodatná odchylka signalizuje velké vzájemné odlišnosti.

Pomocí pravidel 1σ a 2σ (viz níže) lze přibližně určit, jak daleko jsou čísla v souboru vzdálená od průměru, resp. hodnoty náhodné veličiny vzdálené od střední hodnoty. Směrodatná odchylka je nejužívanější míra variability.

Pravidlo 1 σ a 2 σ

Jedná se o empirické pravidlo, jehož platnost závisí na konkrétním případě, proto je formulováno obecně. Lze je však velmi dobře použít pro základní orientaci v rozložení hodnot souboru nebo náhodné veličiny.

V případě směrodatné odchylky, jde-li o náhodnou veličinu, pak pravděpodobnost, že se hodnota náhodné veličiny bude od střední hodnoty lišit nejvýše o jednu směrodatnou odchylku, je výrazně vyšší než 0,5 (za předpokladu normálního rozdělení je to 68%); pravděpodobnost, že se hodnota bude lišit nejvýše o dvě směrodatné odchylky, je velmi vysoká (při normálním rozdělení cca 95%).

19. VÝSLEDKY

Soubor sledovaných vzorků tvořilo 26 378 vzorků pacientů ve věku od 3 do 86 let, jejichž likvor byl vyšetřen v biochemické laboratoři Na Homolce v letech 1999 – 2006. V základním rozdělení pracujeme s počty vzorků, nikoliv s čísly pacientů. U pacientů byla prováděna opakovaná vyšetření, jejich počet nebyl jednotný, proto v dalším podrobnějším rozboru / věkové kategorie u jednotlivých diagnóz./ pracujeme s rodnými čísly. Nesouhlasí tedy součty jednotlivých tabulek s celkovým počtem vzorků u dané diagnózy...Dále je rozdílný počet vyšetření beta2 -mikroglobulinu v seru a v likvoru / ne vždy byl současně proveden/.

Soubor byl podle diagnóz /nejdříve pracovních a posléze potvrzených/ rozdělen do skupin:

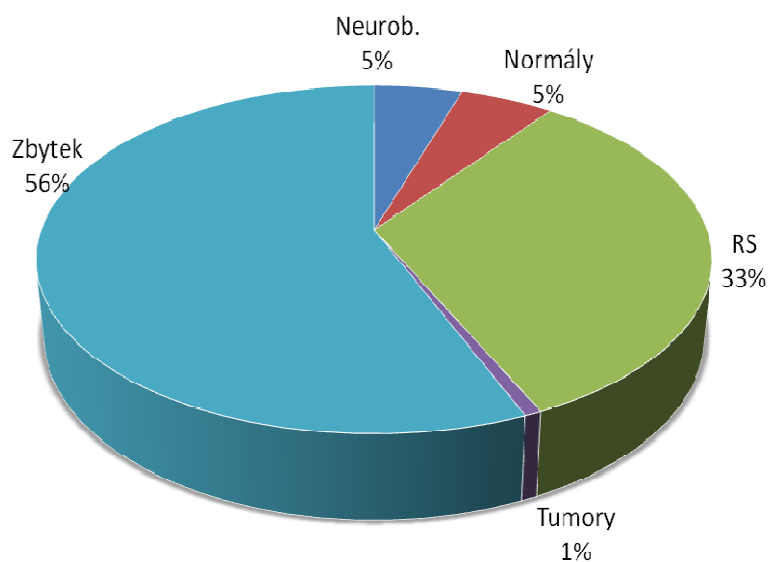
1. demyelinizační onemocnění – RSM
2. neuroboreliosa
3. tumory

4. ostatní

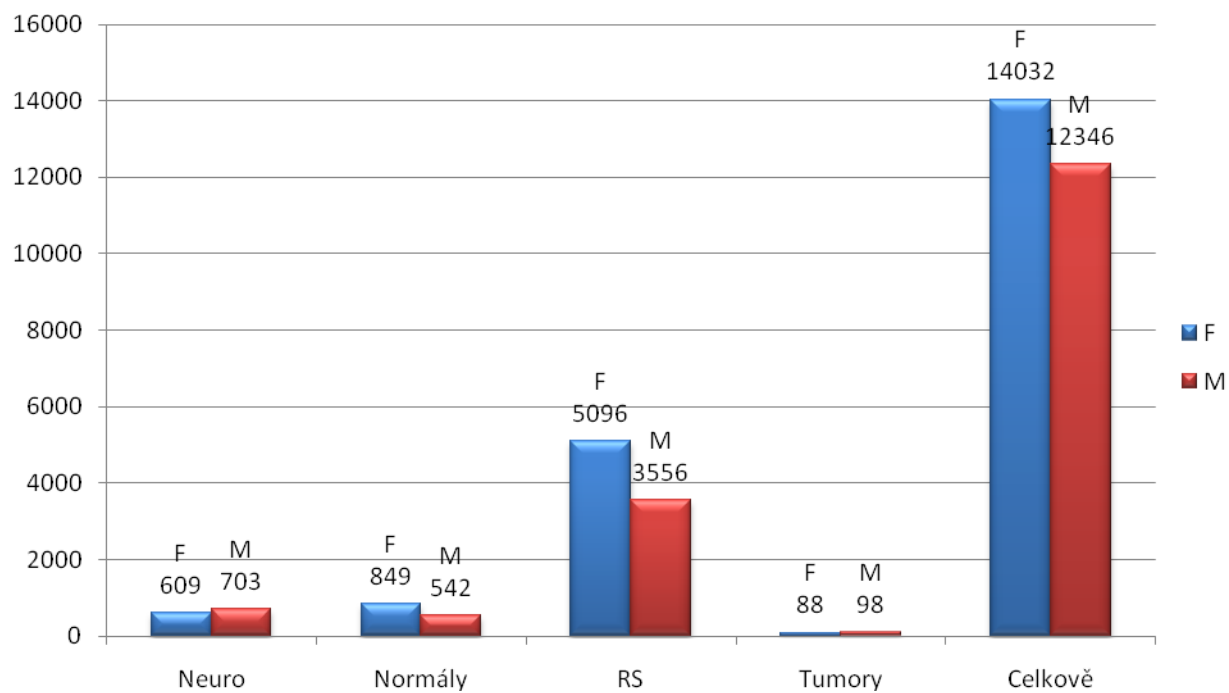
Ve vyšetřovaných skupinách byla vypočítaná průměrná hodnota hladiny beta2-mikroglobulinu, směrodatná odchylka. Dále byly porovnány výsledky dle věkových skupin a mezi muži a ženami.

Procentuelní zastoupení jednotlivých skupin ukazuje graf č. 1, rozdělení podle pohlaví – viz graf č. 2:

Graf č. 1 - Procentuelní zastoupení jednotlivých skupin



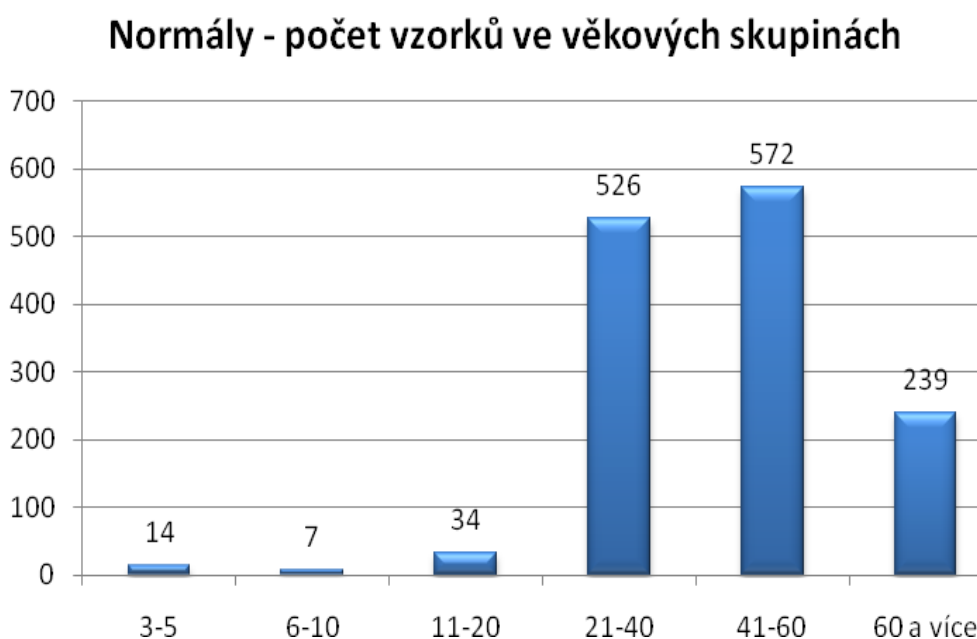
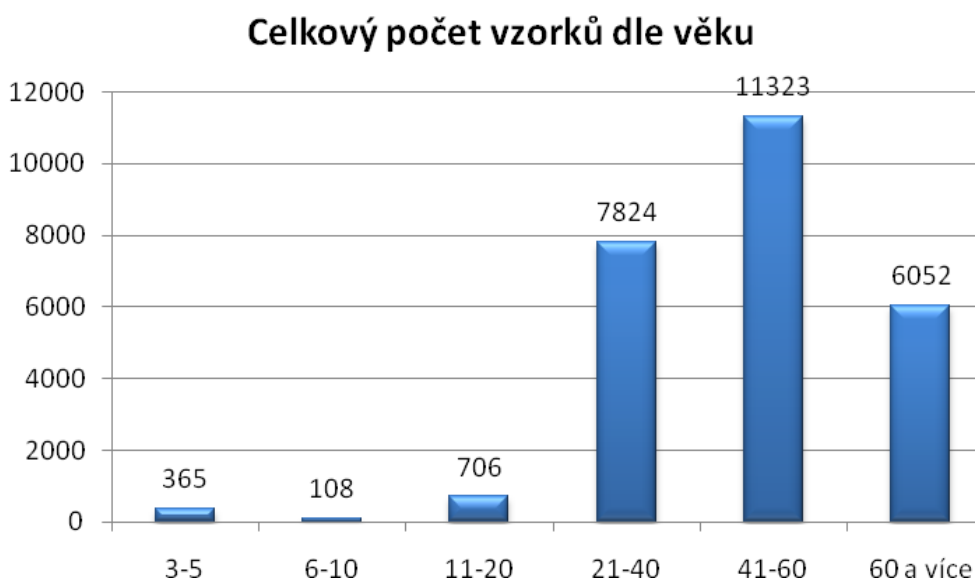
Graf č. 2 - rozdělení podle pohlaví



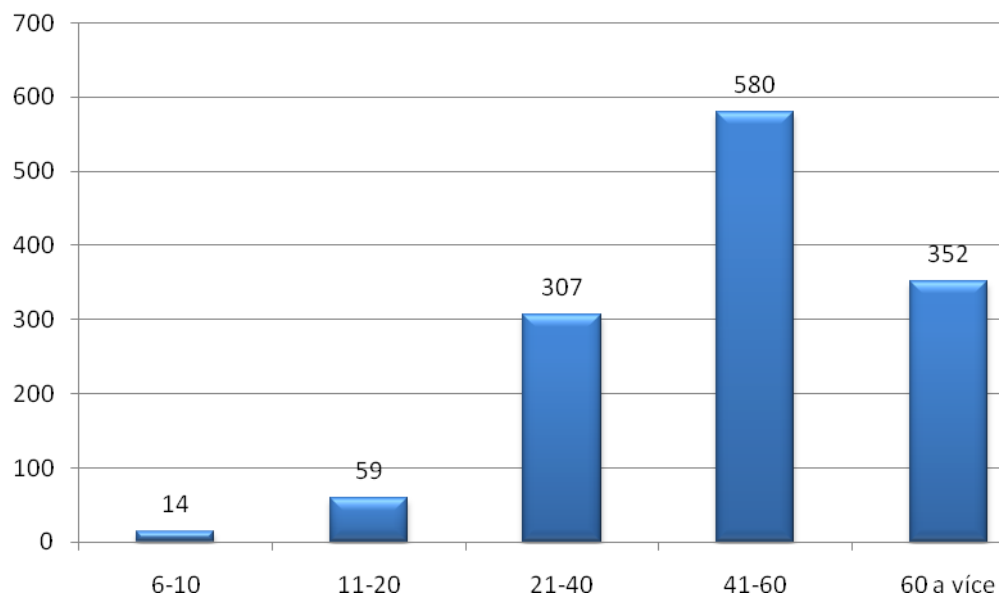
Graf č. 3 ukazuje počet vzorků rozdělených podle stanovených věkových skupin. Ve věkovém rozmezí 0-3 roky nebylo vyšetřené statisticky významné množství vzorků /pro naše potřeby minimálně 10 vzorků/.

Dále následuje rozdělení podle věkových skupin v jednotlivých skupinách.

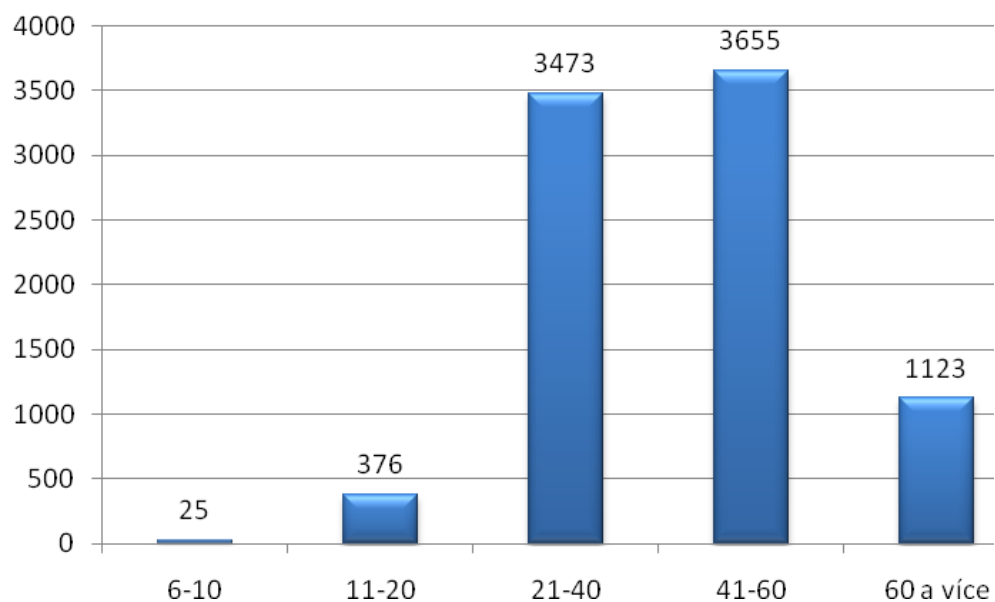
Graf č. 3 - počet vzorků v jednotlivých skupinách dle věku



Neuroborelióza - počet vzorků ve věkových skupinách

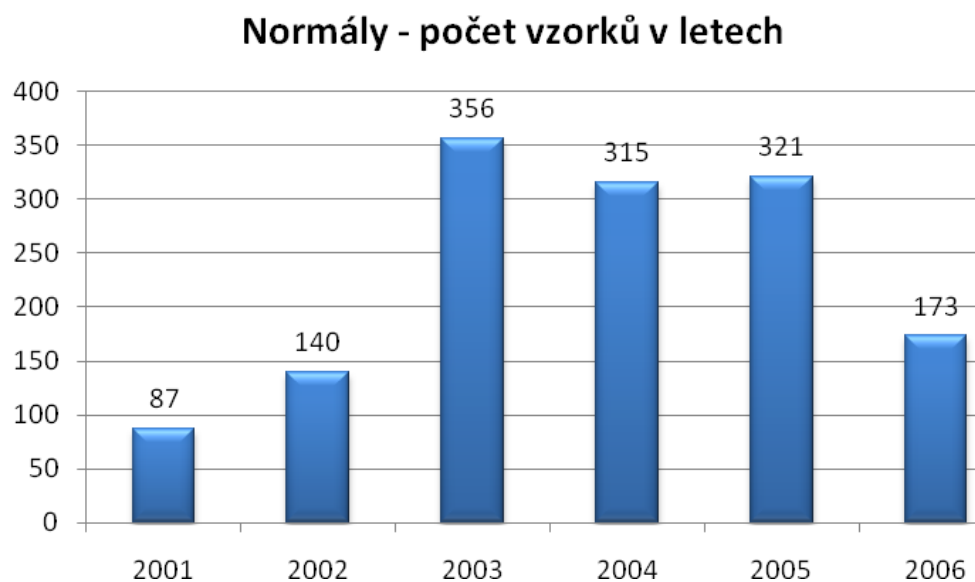
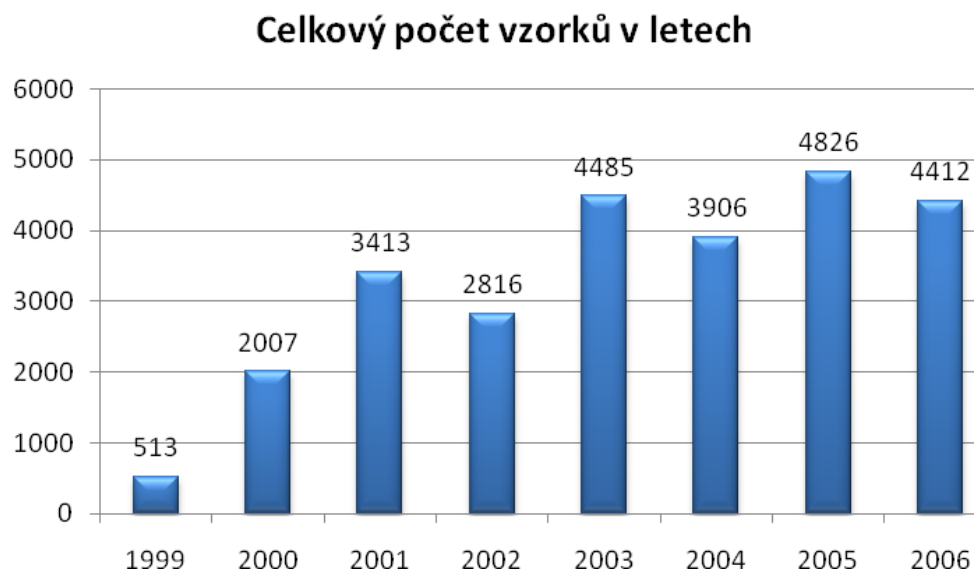


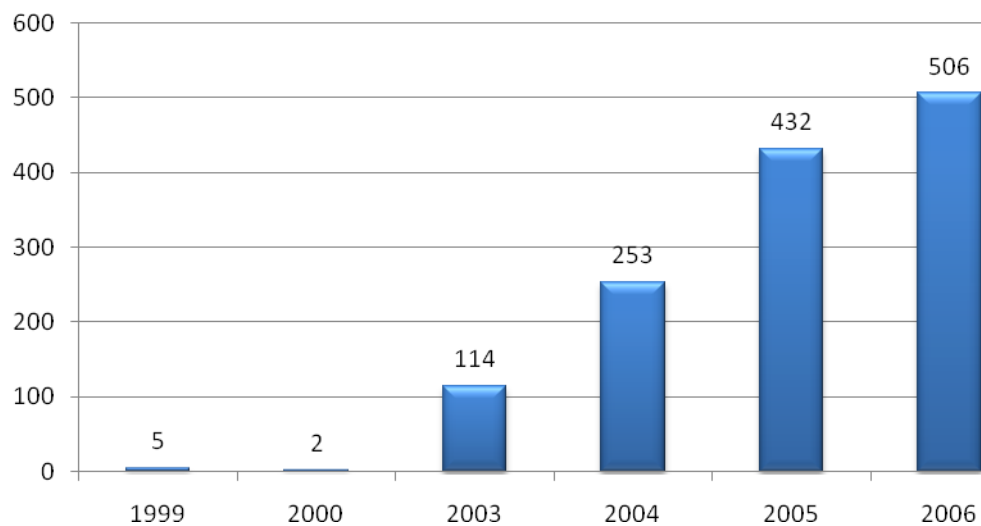
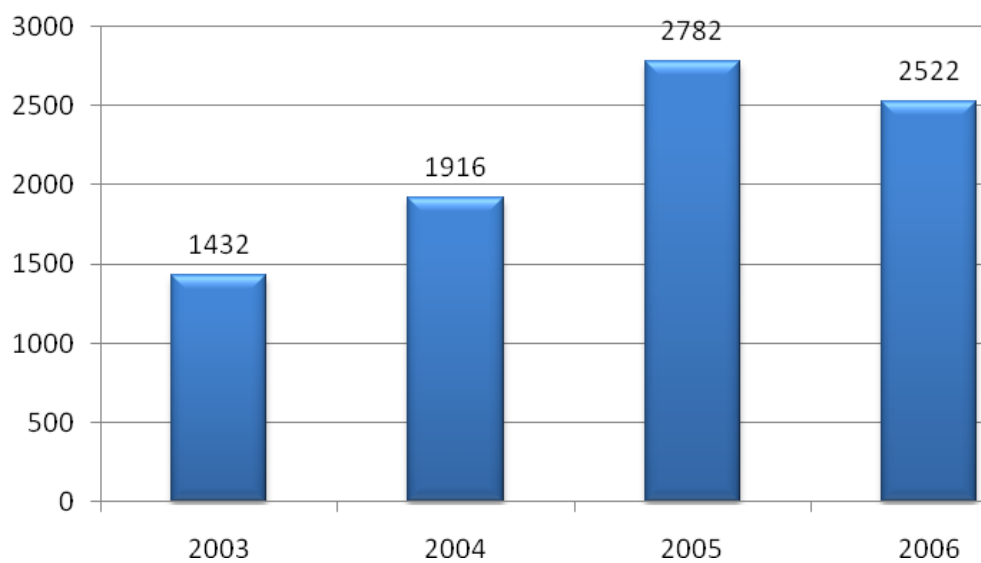
RS - počet vzorků ve věkových skupinách



Graf č. 4 ukazuje rozdělení vzorků podle roků odběru celkově a v jednotlivých skupinách.

Graf č. 4 – počet odběrů dle roků

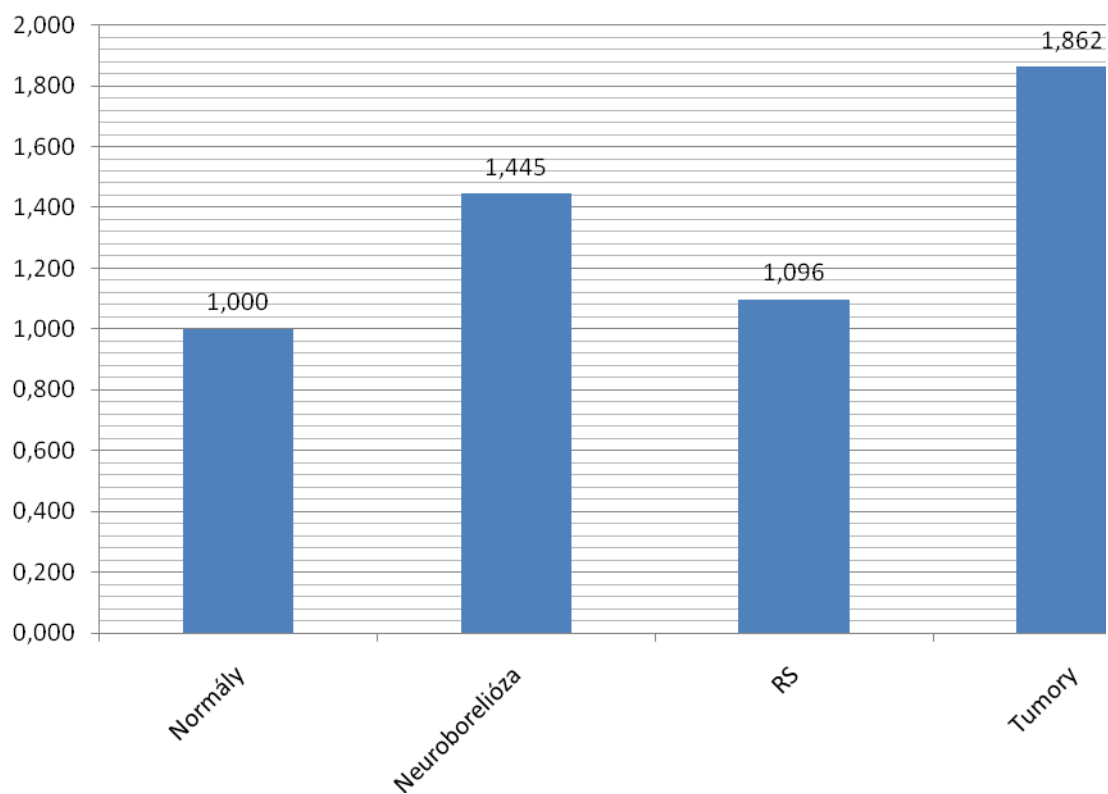


Neuroborelióza - počet vzorků v letech**RS - počet vzorků v letech**

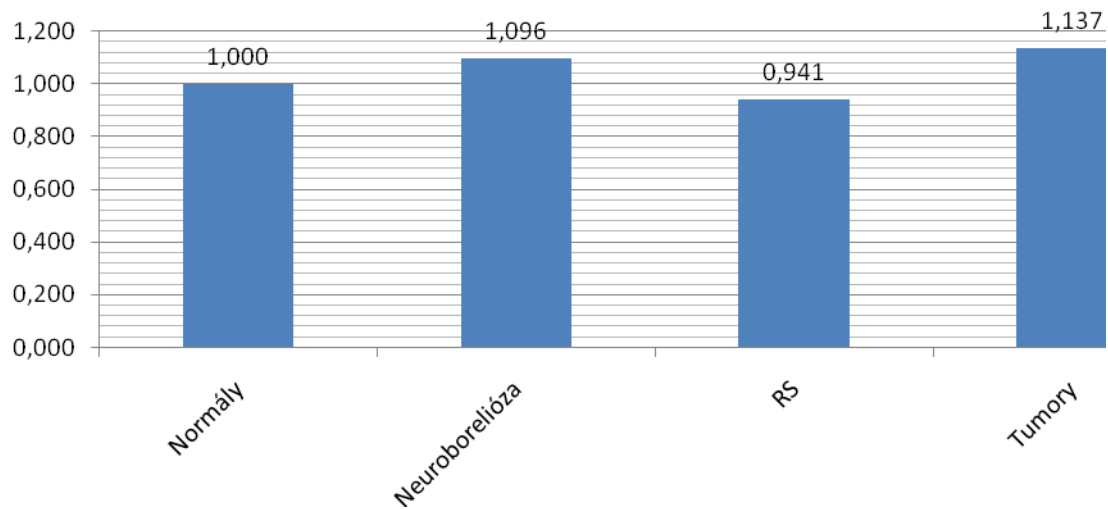
Graf č. 5 ukazuje průměrné hodnoty beta2-mikroglobulinu v likvoru a v séru porovnané k průměrným fyziologickým hodnotám /normály/.

Graf č. 5 - průměrné hodnoty beta2-mikroglobulinu v likvoru a v séru

Ø B2-CSF vztaženo na normály



Ø B2-S vztaženo na normály



a. Tabulka I:

Průměrné hodnoty beta2-mikroglobulinu v likvoru /CSF beta 2/ a v séru /S beta 2/ ve skupině fyziologických nálezů /Na/ a patologických nálezů /pb/, dále ve skupinách roděných podle cytologických nálezů /LO lymfocytární oligocytoza, LP lymfocytární pleiocytoza, MO monocytární oligocytoza, MP monocytární pleiocytoza, GO granulocytární oligocytoza/.

Hodnota Q je podíl hodnoty beta2-mikroglobulinu v likvoru a v séru – v jednotlivých skupinách.

Quantity	CSF beta2	S beta2	Q
Na	1,720	2,269	0,758
pb	2,203	2,186	1,008
LO, LP	2,227	2,125	1,048
MO, MP	1,954	2,352	0,831
GO, GP	3,816	2,795	1,366
TO, TP	3,202	2,580	1,241

b. Tabulka II:

Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky beta2-mikroglobulinu v likvoru a v séru u jednotlivých podskupin.

$\bar{\phi}$ = aritmetický průměr
hodnot

σ = směrodatná
odchylka

počet měření

	$\bar{\phi}$ B2-CSF	$\bar{\phi}$ B2-S	σ B2-CSF	σ B2-S	B2-CSF	B2-S
Normály	1,720	2,269	3,490	5,245	922	770
Neurobor.	2,485	2,488	5,580	5,226	551	531
RS	1,885	2,136	0,917	0,986	3 012	2 906
Tumory	3,202	2,580	2,715	1,967	103	41

c. Tabulka III:

Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky beta2-mikroglobulinu a likvoru a v séru u mužů a žen.

	\bar{x} = aritmetický průměr hodnot		σ = směrodatná odchylka		počet měření	
ŽENY	\bar{x} B2-CSF	\bar{x} B2-S	σ B2-CSF	σ B2-S	B2-CSF	B2-S
Normály	1,509	2,325	0,709	6,447	580	501
Neuroborelióza	2,681	2,803	8,553	7,998	226	221
RS	1,828	2,131	0,903	0,988	1 676	1 630
Tumory	3,073	1,998	2,436	0,809	50	22

	\bar{x} = aritmetický průměr hodnot		σ = směrodatná odchylka		počet měření	
MUŽI	\bar{x} B2-CSF	\bar{x} B2-S	σ B2-CSF	σ B2-S	B2-CSF	B2-S
Normály	2,074	2,165	5,654	1,210	341	269
Neuroborelióza	2,348	2,263	1,453	1,125	325	310
RS	1,955	2,143	0,931	0,984	1 336	1 276
Tumory	3,323	3,254	2,996	2,675	53	19

d. Tabulka IV:

Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky beta2-mikroglobulinu v likvoru a v séru u podskupin v jednotlivých věkových kategoriích.

	\bar{x} = aritmetický průměr hodnot		σ = směrodatná odchylka		počet měření	
0 - 2 roky	\bar{x} B2-CSF	\bar{x} B2-S	σ B2-CSF	σ B2-S	B2-CSF	B2-S
Normály	---	---	---	---	---	---
Neuroborelióza	---	---	---	---	---	---
RS	---	---	---	---	---	---
Tumory	---	---	---	---	---	---

	$\bar{\sigma}$ = aritmetický průměr hodnot		σ = směrodatná odchylka		počet měření	
	$\bar{\sigma}$ B2-CSF	$\bar{\sigma}$ B2-S	σ B2-CSF	σ B2-S	B2-CSF	B2-S
3 - 5 let						
Normály	1,900	5,500	1,332	---	8	1
Neuroborelióza	---	---	---	---	---	---
RS	---	---	---	---	---	---
Tumory	---	---	---	---	---	---

	$\bar{\sigma}$ = aritmetický průměr hodnot		σ = směrodatná odchylka		počet měření	
	$\bar{\sigma}$ B2-CSF	$\bar{\sigma}$ B2-S	σ B2-CSF	σ B2-S	B2-CSF	B2-S
6 - 10 let						
Normály	0,500	2,100	0,566	---	2	1
Neuroborelióza	4,300	3,670	---	---	1	1
RS	4,300	3,670	---	---	1	1
Tumory	---	---	---	---	---	---

	$\bar{\sigma}$ = aritmetický průměr hodnot		σ = směrodatná odchylka		počet měření	
	$\bar{\sigma}$ B2-CSF	$\bar{\sigma}$ B2-S	σ B2-CSF	σ B2-S	B2-CSF	B2-S
11 - 20 let						
Normály	1,605	1,987	0,591	0,808	22	21
Neuroborelióza	2,688	2,383	1,686	1,497	8	7
RS	1,790	2,099	0,851	0,867	88	81
Tumory	---	---	---	---	---	---

	$\bar{\sigma}$ = aritmetický průměr hodnot		σ = směrodatná odchylka		počet měření	
	$\bar{\sigma}$ B2-CSF	$\bar{\sigma}$ B2-S	σ B2-CSF	σ B2-S	B2-CSF	B2-S
21 - 40 let						
Normály	1,771	2,309	5,571	8,144	352	312
Neuroborelióza	1,778	1,868	0,842	0,656	131	123
RS	1,714	1,973	0,808	0,893	1 208	1 165
Tumory	2,681	1,453	3,328	0,938	21	6

	$\bar{\sigma}$ = aritmetický průměr hodnot		σ = směrodatná odchylka		počet měření	
	$\bar{\sigma}$ B2-CSF	$\bar{\sigma}$ B2-S	σ B2-CSF	σ B2-S	B2-CSF	B2-S
41 - 60 let						
Normály	1,606	2,083	0,713	0,879	378	319
Neuroborelióza	2,734	2,669	8,306	7,812	240	232
RS	1,907	2,102	0,939	0,964	1 272	1 223
Tumory	3,222	2,201	2,229	1,428	39	16

	$\bar{\sigma}$ = aritmetický průměr hodnot		σ = směrodatná odchylka		počet měření	
	$\bar{\sigma}$ B2-CSF	$\bar{\sigma}$ B2-S	σ B2-CSF	σ B2-S	B2-CSF	B2-S
60 a více let						
Normály	1,897	2,701	0,841	1,474	160	116
Neuroborelióza	2,656	2,690	1,661	1,277	171	168
RS	2,298	2,669	1,003	1,118	443	436
Tumory	3,437	3,255	2,849	2,416	43	19

19.1. Demyelinizační onemocnění - roztroušená skleróza:

- Skupina obsahuje celkem 8652 vyšetřených vzorků v daném sledovaném období.
- Diagnóza potvrzena klinikou, imuno elektroforesou.
- Věková hranice je: 6 let – 86 roků.
- Průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu v mozkomíšním moku: **1,885**, směrodatná odchylka **0,917**.
- Průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu v séru: **2,136**, směrodatná odchylka **0,986**.
- Závislost na pohlaví se nezdá být přesvědčivá.
- Závislost na věku: Ve věkové skupině 3 – 6 let je průměrná hodnota beta2 - mikroglobulinu vyšší než je průměrná hodnota celé skupiny. Ve skupině více než 60 let je rovněž vyšší.

19.2. Neuroboreliosa:

- Skupina obsahuje celkem 1312 vyšetřovaných vzorků ve sledovaném období.
- Diagnóza je potvrzena stanovením hladiny protilátek proti boreliose a při sporném nálezu vyš. Western Blot.
- Věková hranice je: 6 let -86 let.
- Průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu v mozkomíšním moku: **2,485**, směrodatná odchylka **5,580**.
- Průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu v séru: **2,488**, směrodatná odchylka **5,226**.
- Závislost na pohlaví není přesvědčivá. Výrazná je vyšší hodnota směrodatné odchylky u neuroboreliosisy u žen - 8,553 oproti směrodatné odchylce u mužů - 1,453. Znamená to větší rozptýl hodnot beta2-mikroglobulinu u žen než u mužů.
- Závislost na věku: Výrazně vyšší průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu ve věkové skupině 6-10 let oproti dalším věkovým skupinám.

19.3. Tumory:

- Skupina obsahuje celkem 186 vyšetřovaných vzorků ve sledovaném období.
 - Diagnóza potvrzena cytologicky /zachyceny nádorové buňky/, a morfoloogickým vyšetřením. Jednalo se o primární mozkové tumory a dále o metastatická postižení CNS.
 - Věková hranice je: 21-86 let.
 - Průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu v mozkomíšním moku: **3,202**, směrodatná odchylka **2,715**.
-

- Průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu v séru: **2,580**, směrodatná odchylka **1,967**.
- Závislost na pohlaví: u žen ve vyšetřované skupině je nižší průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu než u mužů.
- Závislost na věku: Nižší průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu v nižších věkových skupinách.

19.4. Normální nálezy:

- U normálních – fyziologických nálezů – průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu v mozkomíšním moku: **1,720**, směrodatná odchylka **3,490**.
- Průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu v séru: **2,269**, směrodatná odchylka **5,245**.

20. DISKUZE

Jak je patrné z výsledků, průměrné hodnoty beta2-mikroglobulinu v mozkomíšním moku jsou značně rozdílné v jednotlivých skupinách.

Zcela jednoznačně nejvyšších hodnot /a řádově signifikantně vyšších/ dosahují u pacientů s nádory. Dále jsou vyšší u pacientů s prokázanou neuroboreliozou.

U pacientů s demyelinizačním onemocněním se blíží k normě.

Hodnoty beta2-mikroglobulinu v séru jsou poměrně vyrovnané u jednotlivých skupin onemocnění.

Nabízí se tedy závěr: Pokud zjistíme hodnoty beta2-mikroglobulinu v mozkomíšním moku takto výrazně zvýšené i pokud se v daném preparátu

nezachytí nádorová buňka, je vysoce pravděpodobné tumorozní onemocnění.

Hodnoty beta2-mikroglobulinu jsou velmi blízké hodnotám normálu u roztroušené sklerózy. Pokud ve vzorku nezachytíme typické plazmocyty, bývá zpravidla cytologický nález rovněž normální nebo velmi blízký normě. Souvisí tedy i tento nález s hladinou beta2-mikroglobulinu?

Závisí hladina tohoto proteinu na stadiu /klinickém stavu/ choroby? Z této práce není možná odpověď na tuto otázku.

Dále - bylo by možno podobně jako je tomu v zahraniční literatuře /viz výše/ u HIV pozitivních pacientů monitorovat úspěšnost léčby i u tohoto onemocnění? /např. po aplikaci betaferonu, apod./

Průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu je u fyziologických nálezů nižší u žen než u mužů /1,509 x 2,074/. Současně je podstatně vyšší směrodatná odchylka u mužů než u žen /5,654 x 0,709/. Vyšší směrodatná odchylka je dále patrná u neuroboreliózy u žen /8,553 x 1,453/ při téměř vyrovnaných průměrných hodnotách. Nabízí se tedy otázka, zda jsou hodnoty beta2-mikroglobulinu v těchto skupinách závislé na pohlaví.

21. ZÁVĚR

Z výše uvedeného vyplývá důležitost a výpovědní hodnota vyšetřování beta2-mikroglobulinu v mozkomíšním moku.

Zcela jistě se nabízí další výzkum a zpracování dalších sporných otázek v této oblasti.

Domnívám se, že velikost souboru dává vysokou výpovědní hodnotu. Proto stanovení průměrných hodnot v jednotlivých skupinách má určitou důležitost. Všechna vyšetření byla provedena na jednom klinickém pracovišti, utvrzuje jejich hodnotu.

Vyšetření daného proteinu by tedy mělo patřit mezi základní vyšetření likvoru, mělo by se provádět rutinně při základním vyšetření likvoru.

Při tak náročném vyšetření, jakým nepochybně odběr mozkomíšního moku pro pacienta je, by mělo být provedeno co možná největší množství vyšetření k ozřejmění diagnózy .

Hladina tohoto proteinu by měla vést ke směřování dalších vyšetření ke stanovení konečné diagnózy.

Ve prospěch, kromě jiného, hovoří nenáročnost a nenákladnost vyšetření, ať na množství odebraného likvoru – není třeba navýšení odběru, tak na množství chemikálií a přístrojového vybavení /v současné době naprostá většina vyšetření je prováděna na specializovaných pracovištích, kam je likvor odeslán, a kde se provádí komplexně celá škála vyšetření/.

Celkové shrnutí výzkumu ukazuje graf č. 5, kdy jsou průměrné hodnoty beta2-mikroglobulinu v likvoru a v séru v jednotlivých skupinách vztažené ke skupině fyziologických nálezů.

Závislost hodnoty beta2-mikroglobulinu na pohlaví nelze spolehlivě prokázat. Patrný je rozdíl průměrné hodnoty u fyziologických nálezů. Výrazně nižší hodnoty proteinu jsou u dětí, ale množství vyšetřovaných vzorků není vysoké. Nabízí se tedy další předmět výzkumu – vyšetření a další zpracování vzorků u dětské populace. Ve vyšších věkových

skupinách je vyšší průměrná hodnota beta2-mikroglobulinu u tumorů nad 40 let a u demyelinizace nad 60 let.

Je tedy závislost hladiny beta2-mikroglobulinu na vyzrálosti /event. nevyzrálosti/ hematolikvorové bariéry?

Dále se nabízí otázka závislosti hladiny beta2-mikroglobulinu na etnické skupině, na zeměpisné šířce, atd.

Je možné zabývat se dalšími nosologickými jednotkami a nálezy v likvoru při těchto diagnózách /např. závrativé stavy, vertebrogenní syndromy, u kterých není fyziologický nález v likvoru, polyneuropatie, dědičná degenerativní onemocnění CNS, .../.

I nadále je tedy otevřená další výzkumná práce ohledně stanovování a sledování hladiny tohoto proteinu.

Poděkování patří těmto osobám:

Doc. MUDr. P. Adam CSc

MUDr. O. Sobek CSc

PhDr. Vl. Matoušek

Mgr. J. Matoušková

Ing. T. Balvín

Ing. L. Vondra

Mgr. D. Vondra

Literatura:

1. Adam P., Kratochvíla J., Táborský L., Průcha M., Sobek O., Zeman D.
Cerebrospinal fluid cytology.
Medica News Publishers
 2. Adam P.
Likvorologie.
In: Duniewicz M., Adam P. Neuroinfekce.
Maxdorf, Praha **1999**: 21-81
 3. Adam P., Cheníčková M.
Nové aspekty sledování proteinových frakcí likvoru.
FONS **1984**: 117
 4. Adam P., Kocinová F., Matoušková A.
Jednoduchá metoda přípravy cytologických preparátů z mozkomíšního moku.
Prakt. Lék., 71 **1991**: 258-259
 5. Adam P.
Lipofagocytární aktivita makrofágů.
Čs.Neurol. Neurochir., 56/89, **1993**: 170-171
 6. Adachi N.
Beta – 2 – microglobulin levels in the cerebrospinal fluid: their value as a disease marker. A review of the recent literature.
Eur. Neurol. 31 **1991**: 181-185
 7. Andreasen N., Minthon L., Davidsson P., Vanmechelen E., Vanderstichele H., Winblad K., Blennow K.
Evaluation of CSF – tau and CSF – abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practise.
Arch. Neurol. 58 **2001**: 373-379
 8. Alarcon A., Garcia-Alix A., Cabanas F., Hernanz A., Pascual-Salcedo D., Martin-Ancel A., Cabrera M., Tagarro A., Quero J
Beta-2 microglobulin concentrations in cerebrospinal fluid correlate with neuroimaging findings in newborns with symptomatic congenital cytomegalovirus infection .
Eur. J Pediatr 165, **2006**: 636-645
 9. Amiel-Tison C., Grenier A.
Neurological assessment during the first year of life.
Oxford University Press, New York **1986**
-

10. An S.F., Scaravilli F.
Early HIV-1 infection of the central nervous systém.
Arch. Anat. Cytol. Pathol. 45, 1997: 94-105
 11. Abdulle S., Hagberg L., Svennerholm B., Fuchs D., Gisslen M.
Continuing intrathecal immunoactivation despite two years of effective antiretroviral therapy against HIV –1 infection.
AIDS 16, 2002: 2145-2149
 12. Aszkanazy BA
Sarkoidosis of the central nervous systém.
J Neuropatol Exp Neurol. 11 1952: 392-400
 13. Baquero-Artigao F., Mendez A., del castillo F., Velazquez R.
Cerebrospinal fluid beta 2- microglobulin values in perinatally acquired cytomegalovirus infection.
Pediatr Infect Dis J 23, 2004: 891-892
 14. Brew BJ, Halman M., Catalan J., Sacktor N., Price RW, Brown S, Atkinson H., Clifford DB, Simpson D., Torres G., Hall C., Power CH, Marder K., Mc Arthur JC, Symonds W., Romero C.
Factors in AIDS Dementia Complex Trial Design: results and Lessons from Abacavir Trial.
Plos Clinical Trials 13, 2007: 0001-0010
 15. Brew BJ, Pemberton L., Blennow K., Wallin A., Hagberg L.
Cerebrospinal fluid amyloid beta 42 and tau levels correlate with AIDS dementia complex.
Neurology 65, 2005: 1490-1492
 16. Brian M. Nolen, Lidiya S. Orlichenko, Adele Marrangoni, Liudomila Velikokhatnaya, Denise Prosser, et al.
An Extensive Targeted Proteomic Analysis of Disease-Related Protein Biomarkers in Urine from Healthy Donors
Plos One 2013: Volume 8, Issue 5, e63368
 17. Csuka E., Hans VH, Amman E., et al.
Cell activation and inflammatory response following traumatic axonal injury in the rat.
Neuroreport 11, 2000: 2587-2590
 18. Csuka E., Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, et al.
IL – 10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF- α , TGF- β 1 and blood - brain barrier function.
J. Neuroimmunol. 101, 1999: 211-221
-

19. Cysique LA, Brew JB, Halman M., Catalan J., Sacktor N., Price RW, Brown S., Atkinson JH, et al.
Undetectable Cerebrospinal Fluid HIV RNA and Beta – 2 Microglobulin Do Not Indicate Inactive AIDS
Dementia Complex in Highly Active Antiretroviral Therapy – Treated Patients.
J Acquir Immune Defic Syndr 39, 2005: 426-429
 20. Enting RH, Prins JM, Jurriaans S., Brinkman K., Portegies P., Lemge JMP
Concentrations of Human Immunodeficiency Virus Type 1 / HIV –1/ RNA in Cerebrospinal Fluid after Antiretroviral Treatment Initiated during Primary HIV –1 Infection.
HIV/AIDS 32, 2001: 1095-1099
 21. Enting RH, Foudraine NA, Lange JMA, Jurrriaans S., Tom van der Poll, Weverling GJ, Portegies P.
Cerebrospinal fluid beta 2-microglobulin, monocyte chemotactix protein-1, and soluble tumour necrosis factor alfa receptors before and after treatment with lamivudine plus zidovudine or stavudine.
J of Neuroimmunology 102, 2000: 216-221
 22. García–Alix A., Martín Ancel A., Ramos MT, Salas S., Pellicer A., Cabanas F., et al.
Cerebrospinal fluid beta2-micrglobulin in neonates with central nervous system infections.
Eur Jpediatr 154, 1995: 309-313
 23. Gisslen M., Rosengren L., Hagberg L., Deeks SG, Price RW
Cerebrospinal fluid sings of neuronal damage after antiretriviral treatment interruption in HIV-1 infection.
AIDS Res Ther 2, 2005: 6
 24. Grey HM, Kubo RT, Colon SM, Poulik MD, Cresswell P., Springer T., Turner M., Strominger JL
The msall subunit of HLA – antigens is beta 2-microglobulin.
J Exp Med 138, 1973: 1608-1612
 25. Hansson SF, Puchdes M., Blennow K., Sjogren M., Davidsson P.
Validation of a prefractionnation method followed by two-dimensional electrophoresis – Applied to cerebrospinal fluid proteins from frontotemporal dementia patiens.
Proteome Science 2, 2004: 1-11
 26. Heyes MP, Ellis RJ, Ryan L., Childers ME, Grant I., Wolfson T., Archibald T., Jernigan TL, and HNRC Group
Elevated cerebrospinal fluid quinolinic acid levels are associated with region – specific cerebrra volume loss in HIV infection.
Brain 124, 2001: 1033-1042
-

27. Holmin S., Soderlund J., Hansbrough JF, et al.
Intracerebral inflammation after human brain contusions.
Neurosurgery 42,1998:291-298
 28. Hoyt DB, Ozkan AN, Hansbrough JF, et al.
Head injury: an immunologic deficit in T – cell activation.
J Trauma 30, 1990: 759-766
 29. Jae Ho Kim,Sang Kwang Lee,Yong Cheol Yoo,Nam Hyun Park,et al.
Proteome analysis of human cerebrospinal fluid as a diagnostic biomarker
in patients with meningioma
Med Sci Monit,2012:450-460
 30. Jaster JH, Dohan FC, Bertorini TE, et al.
Solitary spinal cord sarcoidosis without other manifestations of systemic
sarcoidosis.
Clin Imaging 21, 1997: 17-22
 31. Jin-Young Kim,Seong-Cheol Park,Jong-Kook Lee,Sang Joon Choi,Kyung-
Soo Hahm,Yoonkyung Park
Novel Antibacterial Activity of Beta-2Microglobulin in Human Amniotic
Fluid
Plos One 2012:Volume 7,Issue 11,e47642
 32. Kawai M., Hirohata S.
Cerebrospinal fluid beta 2-microglobulin in neuro-Behcet's syndrome.
J of neurological Sciences 179, 2000: 132-139
 33. Lenzlinger PM, Hans VJH, Joller-Jemelka HI., Trentz O., Morganti-
Kossmann MC, Kossmann T.
Markers for Cell-Mediated Immune Response Are Elevated in
Cerebrospinal Fluid and serum After Severe Traumatic Brain Injury in
Humans.
Journal of Neurotrauma, Vol.18,Number 5,2001:479 -486
 34. Lindstrom AM, Hesse C., Rosengren L., Frensdman P., Davidsson P.,
Blennow K.
Normal levels of clusterin in cerebrospinal fluid in Alzheimer's
disease,and no change after acute ischemic stroke.
J Alzheimer's Dis. 3, 2001: 435-442
 35. Martinez M., Frank A., Hernanz A.
Relationship of interleukin 1-beta and beta 2-microglobulin with
neuropeptides in cerebrospinal fluid of patients with dementia of the
Alzheimer type.
J Neuroimmunol. 48, 1993: 235-240
-

36. Neiryneck N., Sunny Eloit, Griet Glorieux, Daniela V. Barreto et al.
Estimated Glomerular Filtration Rate Is a Poor Predictor of the Concentration of Middle Molecular Weight Uremic Solutes in Chronic Kidney Disease
Plos one 2012: Volume 7, Issue 8, e44201
 37. Ott M., Demisch L., Engelhardt W., et al.
Interleukin -2, soluble interleukin 2-receptor, neopterin, L-tryptophan and beta 2 - microglobulin levels in CSF and serum of patients with relapsing-remitting or chronic -progressive multiple sclerosis.
J. Neurol. 241, 1993: 108-114
 38. Puchades M., Hansson SF, Nilsson CL, Andreasen N., Blennow K., Davidsson P.
Proteomic study of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease.
Molecular Brain Research 118, 2003: 141-144
 39. Racek P., Zeman D.
Vyšetření mozkomíšního moku.
Laboratorní diagnostika 2000: 363-389
 40. Reiber H.
The discrimination between different blood-CSF barrier dysfunction and inflammatory reactions of the CNS by a recent evaluation graph for the protein profile of cerebrospinal fluid.
J. Neurol 224, 1980: 89-99
 41. Sickmann A., Dormeyer W., Wortelkamp S., Woitalla D., Kuhn W., Meyer HE
Towards a high resolution separation of human cerebrospinal fluid.
J of Chromatography B 771, 2002: 167-196
 42. Saleh S., Saw Ch., Marzouk K., Sharma O.
Sarcoidosis of the Spinal Cord: Literature Review and report of Eight Cases.
J of the national med Association 98, 2006: 965-975
 43. Schwarcz AM, Kohler C.
Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid.
Neurosci Lett 38, 1983: 85-90
 44. Sonnerborg AB, Von Stedingk LV, Hansson LO, et al.
Elevated neopterin and beta 2-microglobulin levels in blood and cerebrospinal fluid occur early in HIV-1 infection.
AIDS 3, 1989: 277-283
-

45. Starmans JJ, Vos J., Van der Helm HJ
The beta 2-microglobulin content of the cerebrospinal fluid in neurological disease.
J. Neurol Sci 33, 1977: 45-49
 46. Štourač P., Ambler Z.
Vyšetření mozkomíšního moku.
In: Ambler Z., Bednařík J., Růžička E. a kol.
Klinická neurologie
Triton 2004: 647-678
 47. Tagarro A., Garcia-Alix A., Alarcón A., Hernanz A., Quero J.
Congenital syphilis: beta 2 – microglobulin in cerebrospinal fluid and diagnosis of neurosyphilis in an affected newborn.
J Perinat. Med. 33, 2005: 79-82
 48. Takahashi S., Oki J., Miyamoto A., Moriyama T., Asana A., Inyaku F., Okuno A.
Beta – 2 microglobulin and ferritin in cerebrospinal fluid for evaluation of patients with meningitis of different etiologies.
Brain and development 21, 1999: 192-199
 49. Tenhunen R., Iivanainen M., Kovanen J.
Cerebrospinal fluid beta 2-microglobulin in neurological disorders.
Acta Neurol.Scand 58, 1978: 366-373
 50. Vincente V., Gonzáles M., López Borrascas A.
Cerebrospinal fluid levels beta 2 microglobulin and ferritin in lymphoproliferative disorders.
Acta PaediatrScand 71, 1982: 325-326
 51. Yilmaz A., Fuchs D., Hagberg L., Nillroth U., Stahle L., Svensson JO, Gisslén M.
Cerebrospinal fluid HIV-I RNA, intrathecal immunoactivation, and drug concentrations after treatment with a combination of saquinavir, nelfinavir, and two nucleoside analogues : the M61022 study.
BMC Infectious Diseases 6, 2006: 1-8
 52. Zhang J., Goodlett DR, Montine TJ
Proteomic biomarker discovery in cerebrospinal fluid for neurodegenerative diseases.
J of Alzheimer's Disease 8, 2005: 377-389
-