

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



Mgr. Jana Švarcová

**Anti-cytoskeletální protilátky u pacientů s roztroušenou
sklerózou a jinými neurologickými onemocněními**

**Anti-cytoskeletal antibodies in patients with multiple sclerosis and
other neurological diseases**

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Ivan Matouš Malbohan, CSc.

Konzultantka: MUDr. Lenka Fialová, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala 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, 28. 5. 2012

Jana ŠVARCOVÁ

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

ŠVARCOVÁ, Jana. Anti-cytoskeletální protilátky u pacientů s roztroušenou sklerózou a jinými neurologickými onemocněními. [Anti-cytoskeletal antibodies in patients with multiple sclerosis and other neurological diseases]. Praha, 2012. 111 stran, 5 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie. Školitel Malbohan, Ivan.

Abstrakt

Předkládaná práce se zabývá úlohou anti-cytoskeletálních protilátek u různých neurodegenerativních onemocnění. Při postupné demyelinizaci dochází k uvolňování strukturálních částí cytoskeletu, jako jsou např. lehké (NF-L) a středně těžké (NF-M) podjednotky neurofilament (NF) či tubulin (TU). Proti těmto uvolněným strukturám se mohou vytvářet protilátky, jejichž stanovení slouží jako marker axonálního poškození.

Cílem této studie bylo zjistit, zda autoimunitní mechanismy proti cytoskeletálním strukturám mohou hrát roli v onemocnění amyotrofickou laterální sklerózou (ALS). Humorální autoimunita byla hodnocena pomocí stanovení protilátek třídy IgG proti lehké a střední podjednotce neurofilament v séru a mozkomíšním moku (MMM) u pacientů s ALS. Dále nás zajímalo, zda existují nějaké souvislosti mezi těmito typy protilátek v séru a v mozkomíšním moku. Dalším cílem bylo porovnat různé populace anti-tubulinových (anti-TU) protilátek v mozkomíšním moku a séru pacientů s roztroušenou sklerózou (RS). Anti-cytoskeletální protilátky byly stanovovány pomocí enzymoimunoanalytických (ELISA) metod. V případě anti-TU protilátek byly testovány dva druhy antigenu: 1) hovězí tubulin (anti-TU_b protilátky), 2) syntetický neuron-specifický oktapeptid tubulinu (anti-TU_s protilátky).

U pacientů s ALS byly pozorovány zvýšené hladiny sérových anti-NF-L protilátek ve srovnání s kontrolní skupinou. Sérové hladiny anti-NF-L protilátek a intratekální anti-NF-M protilátky úzce souvisely se stupněm postižení. Pozitivní korelace anti-NF-L protilátek s hladinami anti-NF-M protilátek byla nalezena u pacientů s ALS v MMM.

Ve skupině RS pacientů byly hladiny anti-TU_s a anti-TU_b protilátek v MMM významně zvýšené oproti skupině zdravých kontrol. Intratekální syntéza anti-TU_s protilátek byla signifikantně zvýšena ve všech sledovaných skupinách. U všech sledovaných skupin byla také nalezena pozitivní korelace hladin anti-TU_b a anti-TU_s protilátek.

Naše výsledky tak ukazují na možné využití anti-cytoskeletálních protilátek u pacientů s různými neurodegenerativními onemocněními.

Klíčová slova: roztroušená skleróza; amyotrofická laterální skleróza; anti-cytoskeletální protilátky; neurofilamenta; tubulin; ELISA metoda

Abstract

This thesis focuses on the role of anti-cytoskeletal antibodies in various neurodegenerative diseases. Autoantibodies against different axonal cytoskeletal proteins, such as the light (NF-L) and medium (NF-M) subunits of neurofilament and tubulin (TU), in serum and cerebrospinal fluid may be generated in response to the release of cytoskeleton from damaged neurons.

The aim of this study was to assess autoimmune involvement in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) as well as to evaluate antibody light and medium neurofilament subunit in serum and cerebrospinal fluid (CSF) of patients with ALS. Furthermore, we were interested in the relationships among these antibodies in the serum and in the CSF as well as between the two anti-NF antibody subtypes. Secondly, the aim was to compare the levels of anti-tubulin antibodies (anti-TU) in cerebrospinal fluid and serum in multiple sclerosis (MS) disease, using bovine tubulin as the antigen in one enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method (anti-TU_b antibodies) and a synthetic neuron-specific octapeptide of tubulin in a second ELISA method (anti-TU_s antibodies).

In the observed groups of ALS patients, serum levels of anti-NF-L antibodies were higher in ALS patients than in controls and serum anti-NF-L antibodies and intrathecal anti-NF-M antibodies were related to patient disability. Positive correlation was found between anti-NF-L levels and anti-NF-M levels in ALS patients and the controls in the CSF.

Levels of CSF anti-TU_s and anti-TU_b antibodies were significantly higher in MS patients compared to the normal control group. The intrathecal synthesis of anti-TU_s antibodies was higher compared to anti-TU_b in all groups. Positive correlation was found between anti-TU_b and anti-TU_s antibodies in the CSF of all examined groups.

Our results point to opportunities anti-cytoskeletal antibodies as using marker of axonal damage.

Key words: multiple sclerosis; amyotrophic lateral sclerosis; anti-cytoskeletal antibodies; neurofilament; tubulin; ELISA method

Poděkování

Především bych ráda poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Ivanu M. Malbohanovi, CSc., a mé konzultantce MUDr. Lence Fialové, CSc., z Ústavu lékařské biochemie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze za jejich odborné vedení a vstřícnost, jakož i za cenné rady, připomínky a podněty, které mi poskytli během studia a trpělivost při sepisování této práce.

Dík si také zaslouží celý tým Laboratoře imunochemie a molekulární diagnostiky – Dita Hudcová, Hana Řeháková a Ludmila Pourová. Poděkování také patří doc. MUDr. Aleši Bartošovi, Ph.D., z Neurologické kliniky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, za poskytnutí vzorků od pacientů pro tuto studii, jejich klinickou charakteristiku a orientaci v oblasti medicíny.

A především děkuji rodině, bez jejíž podpory by mé studium nebylo možné.

Tato práce byla podporována výzkumným záměrem MŠMT Patofyziologie neuropsychiatrických onemocnění a její klinické aplikace č. 0021620816 a grantem Ministerstva zdravotnictví ČR 8491-3.

Obsah

1	Úvod	9
1.1	Roztroušená skleróza	9
1.1.1	Typy nemoci.....	10
1.1.2	Projevy nemoci, stanovení diagnózy RS a léčba.....	11
1.1.3	Humorální imunita	13
1.2	Axonální poškození u roztroušené sklerózy	15
1.2.1	Mechanismus axonálního poškození	15
1.2.2	Průkaz axonálního poškození.....	16
1.3	Amyotrofická laterální skleróza	18
1.3.1	Formy nemoci ALS.....	19
1.3.2	Etiologie a patogeneze	20
1.3.3	Projevy nemoci, stanovení diagnózy ALS a léčba.....	22
1.4	Cytoskelet neuronů.....	23
1.4.1	Střední filamenta	23
1.4.2	Mikrotubuly.....	29
1.5	Axonální transport a molekulové motory	31
1.6	Vlastní cytoskeletální antigeny u pacientů s RS a ALS.....	32
1.7	Protilátky proti neuronálním antigenům	34
1.7.1	Antimyelinové protilátky	34
1.7.2	Antiaxonální protilátky	36
1.7.3	Autoprotilátky proti cytoskeletálním proteinům u různých neurodegenerativních onemocnění	37
1.7.4	Protilátky u pacientů s ALS	38
2	Cíle výzkumné práce	40
3	Metodika a soubory pacientů.....	41
3.1	Materiál	41
3.2	Přístroje	43
3.3	Statistika.....	43
3.4	Postup stanovení anti-cytoskeletálních protilátek	44
3.4.1	Příprava antigenů	44
3.4.2	Stanovení anti-cytoskeletálních protilátek - ELISA metoda.....	44

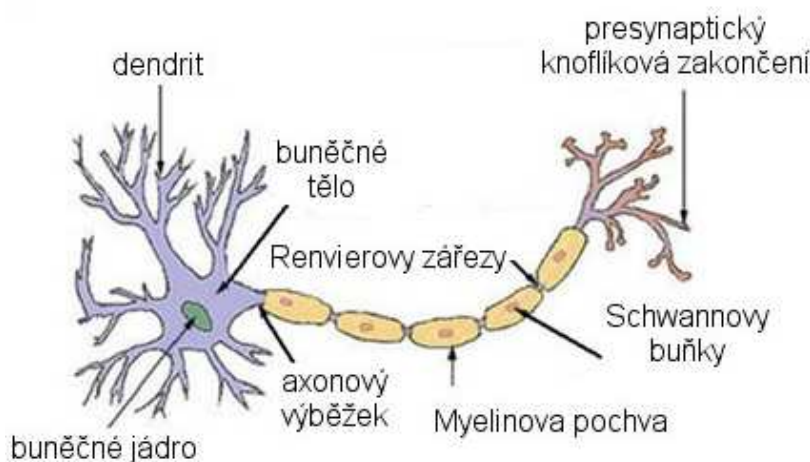
3.4.3	ELISA-VIDITEST	47
3.5	Soubory pacientů.....	48
3.6	Stanovení základních biochemických markerů a výpočty	50
4	Výsledky.....	53
4.1	Protilátky proti tubulinu	53
4.1.1	Zhodnocení protilátek	54
4.2	Protilátky proti neurofilamentům u pacientů s ALS	61
4.2.1	Zhodnocení protilátek	61
5	Diskuze	67
5.1	Výsledky – antitubulinové protilátky.....	67
5.2	Výsledky – protilátky proti neurofilamentům u pacientů s ALS	69
6	Shrnutí	71
7	Seznam použitých zkratk	73
8	Seznam citované literatury	76
	Publikace týkající se tématu dizertační práce (s IF):	90

1 Úvod

1.1 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (RS) je chronické zánětlivé onemocnění centrálního nervového systému (CNS), při kterém dochází k demyelinizaci nervových vláken a jejich přímé ztrátě. Jedná se o autoimunitní (imunopatologické) onemocnění, kdy cílovými antigeny pro autoimunitní útok jsou antigeny myelinové pochvy, obalující nervová vlákna centrálního nervového systému.

Postihuje nejčastěji jedince mezi 20-40 lety, velmi zřídka je diagnostikována před 12. rokem a po 55. roce. Pro mnoho autoimunitních onemocnění bylo zjištěno, že jsou jimi postihovány více ženy než muži. V tomto případě je výskyt u žen vyšší v poměru přibližně 2 : 1. U případů s časným a pozdním začátkem nemoci je poměr žen vůči mužům ještě vyšší, 3 : 1 a 2,4 : 1. Výskyt RS také ovlivňuje zeměpisná šířka. Zvyšuje se vzdáleností od rovníku, nejhojnější je v mírném pásu severní polokoule (1).



Obrázek 1-1: Nervová buňka, struktura neuronu (převzato a upraveno (2)).

Onemocnění je charakteristické vznikem mnohočetných zánětlivých ložisek (tzv. plaků) v bílé hmotě mozku a míchy. Plaky mají nejčastěji velikost několika milimetrů až centimetru (1, 3). V placích dochází nejen ke ztrátě myelinové pochvy nervového vlákna (demyelinizace), ale i k přerušení kontinuity samotného axonu v časných stádiích onemocnění (obrázek 1-1). Zatímco za příhodných okolností může „nahý“ axon částečně znovu myelinizovat (tzv. remyelinizace), přerušení axonu znamená nevratnou změnu, zánik vedení, a tudíž i funkce.

Za iniciátory nemoci jsou považovány (autoagresivní) T-lymfocyty, které rozpoznávají myelinové antigeny. Jsou však nalézány i v periferní krvi zdravých jedinců. Rozdíl je zde ale ve schopnosti aktivace na podnět. U pacientů s RS jsou tyto lymfocyty schopny aktivace a pomnožení v takovém množství, které je již kritické pro zahájení autoagresivního útoku a přestupují přes hematoencefalickou bariéru (1, 3).

Roztroušená skleróza byla velmi výstižně pojmenována; z řeckého skleros, což znamená tvrdý, tuhý. Většina zánětlivých onemocnění končí zhojením lézí gliovou jizvou (astroglióza). Vzniká tak hutnější konzistence akumulovaných astrocytů oproti sousední mozkové tkáni. Protože tato ložiska (plaky, léze) jsou v CNS rozseta v různých oblastech, dostalo onemocnění ještě přídomek „roztroušená“.

Jako hlavní model, od něhož jsou odvozovány patologické představy o RS je experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE). První pokus o vyvolání akutní diseminované encefalomyelitidy provedl T. M. Rivers roku 1933; dlouho však trvalo, než byl dán tento model do souvislosti s onemocněním RS (4, 5).

Experimentální autoimunitní encefalomyelitida je indukována v geneticky vnímavém kmeni inbredních myši parenterální aplikací imunogenních složek myelinu spolu s tzv. Freundovým adjuvans, což je suspenze usmrcených mykobakterií kmene bovis (BCG) v purifikovaném rostlinném oleji. U imunizovaných zvířat se vyvíjí onemocnění, které se histopatologickým i klinickým průběhem podobá RS u člověka (6, 7).

1.1.1 Typy nemoci

Různý výskyt RS v různých etnických skupinách ukazuje na to, že kromě zevních faktorů rozhoduje velkou měrou o vnímavosti vůči této chorobě genetické pozadí. Genetický základ nepochybně spolurozhoduje i o typu a průběhu onemocnění (8).

U zhruba 80-85 % pacientů začíná onemocnění první atakou. Jde o akutně vzniklé příznaky trvající nejméně 24 hodin, které způsobí zánětlivé demyelinizační ložisko v jedné či více oblastech CNS. Tyto první relapsy se označují jako tzv. klinicky izolovaný syndrom (CIS) (9). RS se nemusí rozvinout u všech pacientů s CIS (10). Období bez klinických projevů mezi atakami (tzv. remise) jsou nepředvídatelně různě dlouhá, od jednoho měsíce po několik let. Jakmile se objeví další neurologické příznaky, hovoří se o relaps-remitentní (RR) RS. V této počáteční fázi RS je také

nejefektivnější protizánětlivá léčba, neboť zde hlavní úlohu hraje autoimunitní zánět. Pokud není zánět dostatečně léčen, většina pacientů během 5-10 let přechází do sekundárně progresivní fáze (SP) RS. Ataky mizí a pozvolna narůstá trvalé neurologické postižení (11).

Primárně progresivní (PP) formou roztroušené sklerózy se označuje pozvolný nárůst neurologického deficitu od počátku příznaků. Vzniká u pacientů v pozdějším věku, přibližně kolem 40-50 let. Vyskytuje se častěji u mužů. Je diagnostikována u 10-15 % pacientů (12, 13).

Prognosticky velmi nepříznivou je maligní, relabující-progredující (RP) forma nemoci, která je charakterizována těžkými atakami a nárůstem neurologického deficitu i mezi relapsy (9, 12).

1.1.2 Projevy nemoci, stanovení diagnózy RS a léčba

Neurologické příznaky jsou dány dráhou, v jejímž průběhu se demyelinizace a axonální ztráta odehrávají. Rozmanitost příznaků tedy odpovídá různým lokalitám mozku, míchy a zrakových nervů.

Nejčastějšími příznaky na začátku nemoci bývají poruchy zraku (tzv. optická neuritida) a poruchy citlivosti. Typické pro RS jsou také poruchy rovnováhy. Přibližně u 30 % nemocných byly pozorovány poruchy učení, pozornosti, rychlosti zpracování informací a paměti (14).

Nejzávažnějším příznakem jsou poruchy hybnosti. Mohou postihovat jednu až všechny čtyři končetiny v různých kombinacích. Reverzibilita těchto poruch je samozřejmě větší na počátku onemocnění.

Kromě ložiskových příznaků však toto onemocnění doprovázejí i příznaky celkové – únava, poruchy spánku, změny nálad. Poruchami nálad trpí až 55 % pacientů s RS. Velmi často je pozorována deprese, jejíž vznik je většinou podmíněn multifaktoriálně. Může se jednat o reakci na onemocnění, přímý důsledek probíhajícího chorobného procesu, vedlejší účinek léčby či souběžně probíhající onemocnění.

Zpočátku se většina těchto poruch může po několika dnech až měsících upravit, v pozdějších stádiích onemocnění však obtíže mohou být již trvalé.

Stanovení diagnózy RS je těžké především v počátečních fázích onemocnění. Cílem diagnostického procesu je prokázat diseminaci zánětlivého procesu v prostoru CNS a čase. Podezření na toto onemocnění významně podporují abnormální výsledky

tří pomocných vyšetření: magnetické rezonance (MR) mozku a míchy, vyšetření mozkomíšního moku (MMM) a evokované potenciály (EP). Definitivní diagnóza je stanovena až podle charakteru průběhu onemocnění.

Pro definitivní stanovení diagnózy RS jsou dnes užívána McDonaldova kritéria, která byla definována v roce 2001 (15) a následně v roce 2005 revidována (16). Zásadním přínosem těchto kritérií je začlenění MR nálezů. Zahrnují tak klinický, laboratorní a radiologický nález (příloha 1).

Rychlost, s jakou neléčená RS progreduje, tedy míra invalidity, závisí na řadě faktorů a v klinické praxi se nejčastěji posuzuje pomocí tzv. Kurtzkeho Expanded Disability Status Scale (EDSS) (17). Škála směřuje neurologický nález a míru postižení (jako schopnost chůze). Stupeň postižení se vyjadřuje číslem a invalidita narůstá od hodnoty 0, pro normální neurologický nález, až po stupeň 10, který značí smrt v důsledku RS.

Doplňkem pro stanovení funkce horních končetin a kognice je Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) (18). Jde o škálu sestávající se ze tří podtestů – testu rychlosti chůze, testu jemné motoriky horních končetin a orientačního testu paměti a koncentrace.

Vyšetření MMM přináší velmi důležité doplňující informace o průběhu chronické zánětlivé reakce v CNS. Konstantním rysem pacientů s RS je intratekální syntéza imunoglobulinů třídy G (IgG) v mozkomíšním moku. Ta se prokazuje kvalitativně přítomností oligoklonálních IgG pásů v MMM nebo kvantitativně zvýšenou produkcí IgG v CNS (19).

Oligoklonální pásy jsou elektroforeticky rozdělené imunoglobuliny IgG pocházející výhradně z MMM. Jejich výskyt podporuje autoimunitní proces v CNS a jsou přítomny až u 95 % pacientů s definitivní diagnózou RS (19-21).

V posledních letech došlo k zásadní změně v terapii RS. Byly zavedeny nejen nové léčebné přípravky, ale změnil se i přístup k léčbě. Je kladen vysoký důraz na časnou diagnostiku a včasné zahájení léčby. Tím vzrostla možnost choroby ovlivnit v jejím dlouhodobém průběhu. Zotavení z ataky se urychluje vysokými dávkami kortikosteroidů (11, 22, 23). Pro dlouhodobou léčbu ke snížení počtu atak a zpomalení progresu nemoci se používá interferon beta (24) či glatiramer acetát (Copaxone) (25, 26). Jde o uměle vytvořený antigen (kopolymer čtyř aminokyselin – glutamát, lysin, alanin, tyrozin), který svou strukturou připomíná myelinový bazický protein (13, 23,

25). U pacientů s opakovanými infekcemi se používají intravenózní imunoglobuliny (IVIG) (13, 23). K léčbě aktivní RS či pro situaci neefektivity léčby výše zmíněnými preparáty je určen Natalizumab (Tysabri) (9). Natalizumab je řazen mezi léky druhé volby a je určen pro imunokompetentní pacienty s aktivní RR-RS, kde selhaly, či nelze použít léky první volby (27).

Vzhledem k finanční náročnosti těchto léků jsou u nás stanovena přísná kritéria pro jejich použití a ostatní pacienti jsou tak odkázáni na klasickou imunosupresi, která se používá u pacientů s jinými autoimunitními chorobami. Různorodá paleta terapeutických možností především v časných stádiích onemocnění nabízí dnes pacientům daleko povzbudivější vyhlídky, než tomu bývalo dříve.

1.1.3 Humorální imunita

Autoimunitní charakter roztroušené sklerózy je podmíněn nejen buněčnými mechanizmy, ale také změnami v humorální imunitě. V séru, mozkomíšním moku nebo v mozkových lézích pacientů s RS byly nalezeny B-buňky, plazmatické buňky, složky komplementu a různé protilátky. Jednoznačným a shodným rysem (u více než 90 %) pacientů s RS je zvýšená intratekální syntéza imunoglobulinů IgG produkovaných plazmatickými buňkami (20, 28).

Zvýšená intratekální syntéza se prokazuje přítomností oligoklonálních pásů v mozkomíšním moku nebo zvýšeným IgG indexem. Oligoklonální pásy IgG v mozkomíšním moku bez sérového korelátu vykazují až 98% senzitivitu, zatímco zvýšený IgG index bývá u 50-80 % pacientů s prokázanou RS (29).

Ačkoli přítomnost oligoklonálních pásů v MMM u pacientů s RS se nyní využívá jako senzitivní laboratorní test k potvrzení klinické diagnózy, mohou oligoklonální pásy být přítomny i u jiných poruch, včetně těch, které jsou nepřímo spojené s infekcí nebo abnormální imunitní reakcí. Nicméně, patogeneze stanovení oligoklonálních pásů u RS je stále nejasná, a to i přes rozsáhlý výzkum jejich antigenních cílů. Proto je (do budoucna) velmi důležité určit specifiku těchto cílových míst, a tím poskytnout významné indicie o etiologii RS (30-33).

Protilátky mohou být součástí obecné „nesmyslné“ protilátkové odpovědi, autoimunitní reakcí na nějaký antigen nebo se může při jejich tvorbě uplatňovat fenomén zvaný molekulární mimikry. V každém případě jsou protilátky součástí patologických změn u RS. Tyto protilátky pacientů s RS rozpoznávají antigeny:

1. Cizorodé – např. viry (viry spalniček, zarděnek, varicella-zoster a herpes simplex) (31)
2. Vlastní – autoantigeny neuronů nebo oligodendrocytů
 - Proteiny a komplexní molekuly myelinu – myelinový bazický protein (MBP), myelinový oligodendrocytární glykoprotein (MOG), glykoprotein asociovaný s myelinem (MAG), proteolipidový protein (PLP), sulfatidy, gangliosidy, Nogo-A a jeho receptor, galaktocerebrosid (34-38)
 - Axonální proteiny – neurofilamenta (39), tubulin (40), tau-protein (41)
3. Vlastní ostatní autoantigeny – např. antikardiolipinové protilátky, protilátky proti nukleárním a tyreoidálním mikrosomálním antigenům, protilátky proti bílkovinám tepelného šoku (tzv. Heat shock proteins), protilátky proti proteazomu, a dvojšroubovici DNA (34)
4. Antigeny „nonsense“ specifity – není totiž jasné, zda B-buněčná odpověď je výsledkem určité charakteristické reakce v rámci RS vyvolávané přítomností antigenu nebo zda se jedná o nespecifickou polyklonální aktivaci B-buněk bez vazby na RS. Zdá se, že alespoň část imunitní reakce je vyvolávána antigenem. Na hledání specifity sérových nebo mozkomíšních (intratekálních) imunoglobulinů bylo vynaloženo velké úsilí, ale antigenní cíl převažující části intratekálních protilátek není dosud jasný (8, 20, 29). Z četných studií vyplývá velká heterogenita protilátek, pravděpodobně jako součást polyspecifické humorální odpovědi u RS. Jedním z vysvětlení je fenomén tzv. rozšiřování epitopů. Po úvodní zánětlivé příhodě se uvolněním nových antigenů může aktivovat autoreaktivní buněčná a humorální imunitní odpověď, která zahrnuje další myelinové a nemyelinové antigeny a epitopy. Protilátky mohou vznikat jako autoimunitní duální reakce na různé antigeny se strukturální podobností fenoménem tzv. molekulárních mimikry. Podle tohoto pojetí jsou protilátky vytvářeny v důsledku přítomnosti exogenních struktur (např. peptidy odvozené od virových partikulí nebo bakterií). Tyto protilátky pak mohou zkříženě reagovat s neurálními antigeny (1, 3, 8, 42).

Cílem klinického využití protilátek je zpřesnění diagnózy, identifikace rizikovějších pacientů, prognózování dalšího osudu nemocného a vhodná volba léčebné strategie. Je možné sledovat jednak celkové a jednak specifické

protilátky proti neuronálním autoantigenům - antimyelinové a antiaxonální protilátky.

V průběhu vyžívání T- a B-lymfocytů dochází ke vzniku receptorových struktur. Jedná se o náhodný proces, který se uskutečňuje bez přítomnosti antigenů a vede ke vzniku autoreaktivních T-lymfocytů. Autoreaktivní T- a B-buňky jsou během vývoje selektovány a většina jich je procesem negativní selekce eliminována (43).

V případě autoimunitní imunopatologické reaktivity je specifická imunitní odpověď zahájena vůči imunodominantním částem molekulového terče a postupně v průběhu imunopatologického procesu zahrnuje další antigenní determinanty. U RS je tedy autoreaktivita zahájena vůči MBP a postupně se šíří na další molekulové terče, MOG, MAG a PLP (1, 8).

1.2 Axonální poškození u roztroušené sklerózy

Roztroušená skleróza je onemocnění CNS, při kterém dochází k poškození myelinu, oligodendrocytů, neuronů a axonů. Ačkoli axonální poškození bylo popsáno již zhruba před šedesáti lety v patologických studiích RS, význam axonální ztráty a poškození byl bohužel dlouho přehlížen (44). Teprve koncem devadesátých let minulého století se začal brát ohled na axonální postižení jako logický podklad trvalé invalidity a důležitý znak v patologii RS (45). Míra poškození axonů koreluje s intenzitou zánětu a je nejvyšší v akutních lézích, přítomna je ale i v tzv. normálně vyhlížející bílé hmotě a méně pak v aktivních lemech chronických plak (46).

1.2.1 Mechanismus axonálního poškození

Mechanismy axonálního poškození a degenerace u onemocnění RS nejsou stále zcela pochopeny, a to i přes rozsáhlé klinické (47), neuroradiologické (48) a neuropatologické (49) studie, které byly prováděny nejen na zvířecích modelech, ale také na buněčné a molekulární úrovni. Předpokládá se, že neurodegenerace u RS může postupovat nezávisle, nebo dokonce zánětu předcházet. Byla potvrzena pozitivní korelace mezi axonální patologií a stupněm zánětu u pacientů s progresivní formou RS (50, 51). Axonální postižení může být způsobeno přímým působením auto-reaktivních protilátek (44, 52) nebo cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů (53), makrofágy,

či proteolytickými enzymy, cytokiny, oxidem dusnatým (53) a volnými radikály (54). Podílejí se také poruchy kalciové homeostázy (40), excitotoxicita glutamátu (54, 55) a mitochondriální poškození (56), (obrázek 1-2). Axonální poškození může být způsobeno také sekundárně akutní nebo chronickou demyelinizací (45), změnami v distribuci sodíkových kanálů (56) a narušením axon-gliových interakcí (57). Vliv může mít také zhoršená regenerace a růst axonů vlivem působení tzv. s myelinem spojených inhibičních faktorů (MAIFs). Doposud je popsáno pět MAIFs faktorů – MAG, MOG, Nogo-A, semaphorin-4D/CD100 a efrin-B3 (56, 58). Např. semaphorin-4D/CD100, označovaný také CRMP-2 hraje roli při diferenciaci nervových buněk a podílí se i na tvorbě axonů. CRMPs je rodinou neuronálních fosfoproteinů, které regulují uspořádání mikrotubulů a zajišťují anterográdní transport látek, důležitých pro růst axonů, podél mikrotubulů. Mutací genů těchto proteinů tak dochází k narušení axonálního transportu (58). Fosforylace narušuje spojování CRMP-2 s heterodimery tubulinu, tubulin nemůže být transportován k *plus*-konci mikrotubulů a tím brání růstu axonu. CRMP-2 se totiž váže přímo na tubulin a má vyšší afinitu k tubulinu než k samotným mikrotubulům (58).

1.2.2 Průkaz axonálního poškození

Příčiny zničení axonů nejsou doposud přesně objasněny, ale poslední dobou se objevují nové možnosti díky rozvoji histochemických metod. Ztráta axonů se dá tak detekovat imunohistochemickými či imunologickými metodami, elektronovou mikroskopií, pomocí MR a dalšími. Procento zničených axonů se pak určuje srovnáním celkového počtu axonů v postižené tkáni ke tkáni nepostižené.

Imunohistochemickými metodami se barví nefosforylovaná neurofilamenta (45). Ve zdravých nervových buňkách se fosforylované formy neurofilament nacházejí především v axonech, nefosforylované formy jsou převážně lokalizovány v oblasti kolem jádra a v dendritech. V případě Wallerovy degenerace, kdy dochází k dysfunkci periferního nervu a distální výběžky nervového vlákna degenerují a zanikají, byla pozorována imunoreaktivita nefosforylovaných neurofilament, porušení axonálního transportu a axonální degenerace distálně od místa poškození (45, 59).

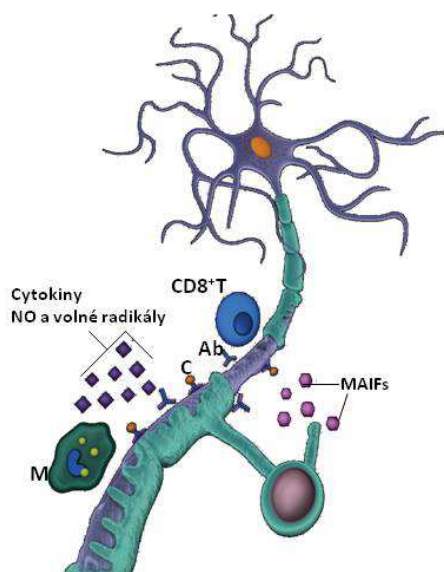
Jako marker akutního axonálního poškození CNS se používá amyloidový prekurzorový protein (APP). Jedná se o transmembránový glykoprotein. Souvisí s rychlým axonálním transportem a jeho nahromadění je známkou poškození v CNS

(60, 61). Akumulace APP byla zjištěna v aktivních lézích a na okrajích lézí neaktivních (62).

Pomocí MR je možno detekovat a odhadovat axonální patologii u pacientů s RS, a to již v časných stádiích onemocnění. Jedná se především o stanovení N-acetylaspartátu (NAA) protonovou MR spektroskopií (63). V současné době je považován za marker axonálního a neuronálního poškození. Magnetická rezonance je užitečná zejména pro studium axonálního poškození, protože umožňuje *in vivo* hodnotit axonální postižení na základě intenzity signálu NAA (64). NAA je výhradně přítomen v centrálním nervovém systému a vzniká při oxidativním metabolismu v mitochondriích. Jeho úloha není zcela přesně známa, ale předpokládá se, že hraje roli v regulaci syntézy proteinů, chrání nervové buňky proti osmotickému stresu a podílí se na metabolismu neurotransmiterů. Trvalý pokles hodnot NAA může být důsledkem axonální ztráty a narušení mitochondriálního metabolismu (64). Snížené hladiny NAA byly prokázány jak v akutních a chronických lézích, tak i v tzv. normálně vypadající bílé hmotě u progresivní formy RS a relaps-remitentní RS se středně těžkým až těžkým postižením (65).

Následkem poškozujících procesů dochází k uvolňování strukturních molekul z cytoplazmy, membrány či jádra nervových buněk do extracelulárního prostoru CNS. Jejich další metabolické, dopravní a „vychytávací“ mechanismy, interakce s CNS tkání stejně tak, jako stupeň poškození tkáně, by bylo možné zjistit z hladin těchto markerů v krvi a mozkomíšním moku (40).

Analýza mozkomíšního moku bývá specifická pro patologii daného onemocnění a může poskytovat informace úzce spojené s onemocněním (56), ale pro některá onemocnění CNS nemusí být zcela charakteristická (56, 66). Bylo by tedy dobré najít nové biomarkery v lépe dostupných tělních tekutinách, např. v periferní krvi, protože látky vznikající v CNS a nacházející se i v krvi, mohou ukazovat na probíhající patologie v CNS (66, 67).



Obrázek 1-2: Mechanismus axonálního poškození (převzato a upraveno z (56)).

NO – oxid dusnatý; M – makrofágy; C – komplement; Ab – protilátky; CD8⁺T- CD8⁺T-lymfocyty; MAIFs – s myelinem asociované inhibiční faktory

1.3 Amyotrofická laterální skleróza

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je progresivní neurodegenerativní onemocnění, pro které je charakteristické poškození a ztráta centrálních i periferních motorických neuronů. I přes velké snahy pro pochopení příčiny a patogeneze choroby však přesné mechanismy způsobující degeneraci motoneuronu zůstávají stále neznámé (68). Některé studie z poslední doby ukazují na cytoskeletální abnormality a autoimunitní mechanismy (69-71). Velkým průlomem bylo objevení mutace genu pro Cu/Zn superoxid dismutázu 1 (SOD1), objevující se u téměř 20 % pacientů s familiární formou ALS.

U amyotrofické laterální sklerózy se můžeme často setkat s označením jako Charcotova choroba, na základě objevení této nemoci francouzským neurologem J. M. Charcotem, který onemocnění popsal, klinicky i patologicky, v roce 1869. Synonymem je také Lou Gehrigova choroba nebo se může v širším slova smyslu použít název nemoc motoneuronu (motor neuron disease, MND) (71).

Nemoc se nejčastěji projevuje ve středním a vyšším věku, v rozmezí 50-65 let. Výskyt je však i u mladších pacientů, mezi 40. a 50. rokem života. 10 % všech případů onemocnění začíná před 40. rokem a 5 % dokonce před 30. rokem. Manifestace

v mladším věku je častěji pozorována u familiární ALS. Incidence se udává kolem 2-3/100 000 obyvatel/1 rok, zvyšuje se s věkem a plynule narůstá do 80 let. Po 80. roce pak dochází k prudkému poklesu výskytu. Prevalence je 4-6/100 000 obyvatel. Postižení jsou více muži než ženy, v poměru 1,5 : 1 či více (72-75).

1.3.1 Formy nemoci ALS

Onemocnění má několik klinických forem a Světová neurologická federace (WFN) klasifikuje ALS do několika podskupin, které se liší převahou počátečních příznaků a průběhem onemocnění (76, 77):

- klasická forma – postižení centrálního a periferního motoneuronu. Vyskytuje se asi v 65 %
- progresivní bulbární paralýza (PBP) – charakteristické bulbární a pseudobulbární příznaky. Převládají poruchy řeči a polykání v důsledku zničení motorických neuronů v mozkovém kmeni. Představuje 15 % onemocnění motoneuronu
- progresivní (spinální) svalová atrofie (PSA) – oslabení a ochabnutí končetinových, trupových a občas i bulbárních svalů. Jde o periferní postižení motoneuronu a vyskytuje se v 8 % případů
- primární laterální skleróza (PLS) – vzácné progresivní onemocnění horního motoneuronu s rozvojem spasticity. Postupně postihuje dolní končetiny, trup, horní končetiny a bulbární svaly. Výskyt je velmi vzácný, udává se 1 případ na 10 milionů
- brachiální amyotrofická diplegie (BAD) – sporadické onemocnění motoneuronu s příznaky slabosti a svalové atrofie, které je na dlouhou dobu omezeno na horní končetiny. Nejsou přítomny centrální ani bulbární příznaky a ani postiženy dýchací svaly. Vyskytuje se asi jen u 2 % případů
- monomelická (spinální) muskulární atrofie (MSA) – (Hirayamova nemoc) postihuje mladší jedince 15-25 věku, častěji muže. Svalová slabost se vyvíjí během 1-4 let. Léze zůstává bez výraznější progresy a lokalizována pouze v horních končetinách.

Nejčastější formou ALS je forma sporadická (SALS), v 5-10 % všech případů forma familiární (FALS). Jde o autozomálně dominantní dědičnost. Pacienti mají genetickou nebo dědičnou formu onemocnění a v těchto rodinách mají potomci 50% riziko, že zdědí zmutované geny a vyvine se u nich ALS. U 20 % familiárních případů lze zjistit až 80 různých mutací Cu/Zn SOD1. Podle pozorovaného mimořádně vysokého výskytu ALS na ostrově Guam v roce 1950 se udává ještě forma guamská (75, 78).

1.3.2 Etiologie a patogeneze

O možné etiologii ALS byly vysloveny různé hypotézy. Podle výsledků základního i klinického výzkumu je patogeneze ALS se selektivní lézí motoneuronů způsobena řetězcem různých mechanismů, jako jsou abnormality superoxiddismutázy, genetické poruchy podobné poruchám u spinálních svalových atrofií, excitotoxicita způsobená nadbytkem glutamátu nebo volných radikálů, oxidativní stres, prozánětlivé cytokiny, vrozená porucha neurofilament (či jejich dysfunkce), porucha kalciové homeostázy, mitochondriální dysfunkce, zvýšená apoptóza motoneuronů nebo autoimunitní proces (72, 74, 79-81). Neexistují však přesvědčivé důkazy, že by některá byla hlavní příčinou onemocnění.

Jen asi u 2 % všech případů ALS se podaří zjistit mutaci genu Cu/Zn superoxid dismutázy 1, jediný genetický defekt prokazatelně spojený se vznikem onemocnění. Zbývajících 98 % zůstává etiologicky nejasných (75). Vzhledem k relativně velké selektivitě postižení motoneuronů u ALS se mnoho patogenetických úvah odvíjí od specifických vlastností těchto buněk. Motorické neurony nejsou schopné dalšího dělení a ubývají s věkem. Jde o největší buňky nervového systému, které mají i značné energetické nároky. K neurodegenerativnímu procesu jsou rezistentní jádra kranálních nervů III., IV. a VI. a Onufovo jádro v sakrální míše, což svědčí o nestejném ovlivňování motoneuronů (72).

Obecně, mezi hlavní mechanismy poškození se řadí:

1. Genetické faktory – u 20 % případů familiární formy ALS byla prokázána mutace genu kódujícího enzym Cu/Zn superoxiddismutázu1. Do dnešní doby bylo zjištěno 135 různých genových mutací na dlouhém raménku 21. chromozomu, které způsobují defekty SOD1 a vedou k onemocnění ALS. K mutacím dochází po celé délce genu, většinou však v oblasti 4. a 5. exonu.

Jedná se o záměnu jedné aminokyseliny, délka proteinu je jinak zachována (82, 83).

2. Excitotoxicita - během posledních deseti let se objevily studie ukazující na potenciální úlohu excitotoxicity glutamátu v patogenezi ALS (84-86). Glutamát je hlavní excitační neurotransmitter v nervovém systému a je nezbytný pro jeho normální funkci. Existují dva hlavní typy glutamátových receptorů - NMDA (N-methyl-D-asparagová kyselina) a AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-izoxazolpropionová kyselina). Důležitou roli v rychlém odstranění glutamátu ze synaptické štěrby hrají gliové buňky, v jejichž membráně se nachází transportér excitačních aminokyselin EAAT2. U ALS je snížena exprese a funkce glutamátového transportního proteinu EAAT2. Lze proto předpokládat jeho zvýšenou citlivost k jakémukoliv zásahu do kinetiky glutamátu (55, 82, 85).
3. Autoimunitní mechanismus – opírá se o existenci experimentálního autoimunitního zvířecího modelu onemocnění motoneuronu, nález aktivovaných T-lymfocytů a depozit imunoglobulinů v šedé hmotě míšni a v motorické kůře pacientů s ALS a přítomnosti protilátek proti Ca^{2+} kanálům u většiny pacientů trpících ALS. Protilátky, které poškozují funkci Ca^{2+} kanálů, napadají terminální zakončení, a tím i funkci motorických neuronů u myší. V klinických studiích byl sledován účinek cyklofosfamidu, azathioprinu, methotrexátu, kortikoidů, plazmaferézy, a dokonce i celotělového ozáření. V žádné z těchto studií však nebyl prokázán příznivý vliv imunosupresivní léčby na průběh onemocnění (75, 78).
4. Nedostatek růstových faktorů – jako příčina onemocnění ALS byl zvažován nedostatek některých faktorů, jako jsou CNF (ciliary neurotrophic factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), IGF-I/II (insulin-like growth factor I/II), NFG (nerve growth factor), LIF (leukemia inhibitory factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) a glial-derived factor. V případě poškození buňky mohou totiž pomáhat přežití motoneuronů. Některé z nich byly dokonce testovány jako možné léky, avšak bez efektu (69, 70).
5. Deficitní neurofilamenta (NF) – strukturní abnormality či akumulace neurofilament jsou pozorovány u několika neurodegenerativních onemocnění, včetně SALS a FALS (76). Mutace v tzv. KSP oblasti, kde dochází k fosforylaci NF, byla prokázána přibližně u 1 % případů sporadické formy ALS (70, 87).

Změny ve stupni fosforylace jsou příčinou rozšíření a elektrostatického odpuzování, čímž dochází nejen k porušení axonu, ale i ke změně interakcí s ostatními součástmi cytoskeletu.

1.3.3 Projevy nemoci, stanovení diagnózy ALS a léčba

Na začátku onemocnění mohou být příznaky natolik mírné, že je pacient často přehlédne. Vzhledem k typu příznaků a progresi choroby může průběh ALS zahrnovat svalovou slabost v jedné nebo více končetinách, ve svalech polykacích, dýchacích a svalech mluvidel, následné zhoršení funkce horních a dolních končetin, nezřetelnou řeč a potíže s vyslovováním, v pokročilejších stádiích pak obtíže při dýchání a polykání. Příznaky se u jednotlivých pacientů liší, stejně tak i pořadí, v jakém se objevují, a průběh progresu se také různí. Progredující svalová slabost a paralýza je však přítomna všeobecně (72, 80, 88).

Stanovení diagnózy onemocnění ALS je velmi obtížné. Dosud totiž nejsou k dispozici žádné specifické testy, které by dokázaly definitivně stanovit ALS.

V roce 1990 byla na konferenci Světové neurologické společnosti (WFN) vypracována kritéria pro diagnostiku ALS. El Escorialská kritéria (EEC, dostala označení podle místa vzniku) byla o čtyři roky později publikována a používala se téměř deset let (89). V roce 2000 byl soubor kritérií revidován. Mezi základní diagnostická kritéria bylo zařazeno i využití elektrofyziologických dat (90). Kritéria jsou založena na známkách postižení v oblasti mozkového kmene, krční, hrudní a bederní části míchy. Dle těchto kritérií se diagnóza označuje jako suspektní, možná, pravděpodobná a jistá (83, 88, 91), (příloha 2).

Do standardního vyšetřovacího programu by také měla patřit biochemická a sérologická vyšetření, lumbální punkce, elektromyografie (EMG) a MR (92).

V současné době zatím neexistuje žádná kauzální terapie ALS. Jedinou používanou a relativně specifickou léčbou je riluzol. K léčbě ALS byl zaveden v roce 1994 (93). Na experimentální úrovni se zdá poměrně perspektivní využití kmenových buněk.

1.4 Cytoskelet neuronů

Cytoskelet je heterogenní síť vláknitých struktur, kterou tvoří navzájem interagující a propojené sítě mikrotubulů, středních filament a aktinových vláken. Existence cytoskeletu je známa od konce 70. let. Jedná se o velmi dynamický systém napojený na další buněčné struktury, především na membránu. Určuje nejen tvar a pružnost buňky, ale také umístění organel. Odpovídá také za všechny druhy buněčného i vnitrobuněčného pohybu (43, 94). Cytoskeletální proteiny se účastní i přenosu signálů a buněčného metabolismu. Cytoskelet tak funguje v buňce jako jeden z nejvyšších organizačních systémů.

Základními stavebními proteiny cytoskeletu jsou mikrotubuly, střední filamenta a mikrofilamenta. Každá z těchto struktur je vytvářena odlišnými třídami proteinů (tabulka 1-1).

Tabulka 1-1: Přehled cytoskeletálních proteinů

druh vlákna	průměr	bílkovina	výskyt (tkáň/buňky)
mikrotubuly	25 nm	α - a β -tubulin	většina buněčných typů
střední filamenta	8-14 nm	keratin vimentin desmin GFAP neurofilamenta (triplet) lamin	epitelie mezenchymové buňky svaly astrocyty nervové buňky jaderná membrána
aktinová vlákna (mikrofilamenta)	7-9,5 nm	α -, β - a γ -aktin	většina buněčných typů, příčně pruhované a hladké svalstvo

1.4.1 Střední filamenta

Střední (intermediární) filamenta tvoří relativně stabilní síť z vláken o průměru 10 nm. Na rozdíl od mikrotubulů a mikrofilament nejsou tvořena jedním proteinem, ale mnoha základními stavebními bílkovinami. Podle podobnosti aminokyselinového složení, sekvence a tkáňového rozšíření se dělí do několika skupin. Proteiny

intermediárních filament tvoří genovou superrodinu zahrnující asi 90 genů (95). Tyto bílkoviny se dělí do pěti základních tříd (96):

- I. a II. typ – řadí se sem tzv. keratiny I. a II. typu. Keratiny I. typu jsou menší a kyselé, keratiny II. typu, jichž je menšina, jsou větší a neutrální či mírně bazické.
- III. typ – do této skupiny patří zejména proteiny vimentin, desmin, kyselý gliální fibrilární protein (GFAP), periferin a syncoilin. Obecně se tato třída intermediárních filament vyskytuje v buňkách pojivových tkání, ve svalových buňkách a neurogliových buňkách.
- IV. typ - samostatnou skupinu tvoří tzv. neurofilamenta a α -internexin, které se spolu s mikrotubuly podílejí na stavbě axonů. Neurofilamenta jsou specifické pro nervovou tkáň. Vznikají v těle neuronu, a poté jsou transportovány do axonů. Alfa-internexin je typický pro raná stadia vývoje nervových buněk.
- V. typ – tento typ proteinů intermediárních filament je výhradně jaderný a je tvořen třídou proteinů zvaných laminy.

Přes odlišnost stavebních bílkovin je struktura všech středních filament podobná. Proteiny všech těchto skupin mají obdobnou středovou oblast a liší se C- a N-koncovými částmi molekuly. Centrální tyčovitá část je tvořena α -šroubovicí, která umožňuje, aby se vždy otočily dvě molekuly a vytvořily tak stabilní dimer. Dimery se poté nekovalentní vazbou spojují do tetramerů, a ty se opět nekovalentními vazbami skládají vedle sebe. Vzniká tak výsledná struktura připomínající lano.

Od mikrotubulů a mikrofilament se střední filamenta liší tím, že se na ně nevážou nukleotidy, pro svoji stavbu potřebují mnohem méně energie a jsou také méně dynamická. Dávají buňkám a tkáním mechanickou podporu a pružnost a zřejmě se neúčastní žádné formy pohybu. Mají mnoho asociovaných proteinů (tzv. MAPs), které zajišťují jejich vazbu na mikrotubuly a na membránu. Nebyly však pro ně nalezeny buněčné motory podobné kinezinům, dyneinům či myozinům (96).

1.4.1.1 Neurofilamenta

Hlavní složkou axonálního cytoskeletu jsou neurofilamenta (NF). Jedná se o heteropolymery skládající se ze tří podjednotek. Lehké podjednotky (NF-L), střední či středně těžké (NF-M) a těžké (NF-H). Tyto podjednotky se diferencují v závislosti na vývoji a „dospělosti“ což odpovídá typu buněk a jejich fyziologickému stavu. NF interagují s dalšími strukturami (složkami) cytoskeletu a tím mohou ovlivňovat a měnit axoplazmatický tok.

Lehká podjednotka (NF-L) se skládá z 543 aminokyselin (AMK) a molekulová hmotnost odpovídá 61 kDa. Ale díky fosforylaci a glykosylaci je migrace při elektroforese v polyakrylamidovém gelu (PAGE) v prostředí dodecylsírany sodného (SDS) velmi pomalá a z tohoto důvodu většina autorů uvádí molekulovou hmotnost 68 kDa určenou z SDS-PAGE (97).

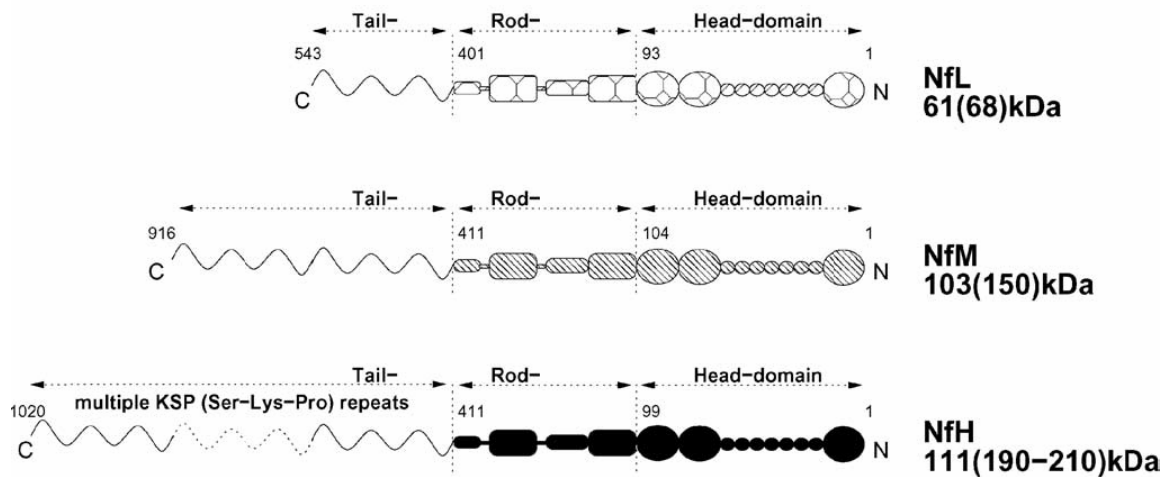
Středně těžká podjednotka (NF-M) je tvořena z 916 AMK zbytků. Molekulová hmotnost je vypočítána na 102,5 kDa, ale při elektroforéze v SDS odpovídá 150 kDa.

Těžká podjednotka (NF-H) je složena z 1020 aminokyselin. Molekulová hmotnost odpovídá 111 kDa. Mnoho autorů však udává molekulovou hmotnost odvozenou z detekce v SDS gelu, která je ale ovlivněna nábojem či hmotností (náboj/hmotnost) fosfátů a proto se pohybuje v rozmezí od 190 do 210 kDa pro různé stupně fosforylace (97).

1.4.1.2 Struktura podjednotek

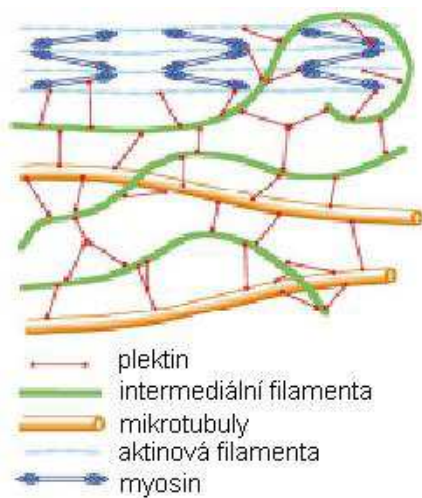
Každá NF podjednotka je složena z vysoce konzervativní α -helikální centrální oblasti o přibližně 310 AMK. Tato střední část vytváří dvouvláknovou strukturu, obklopující „hlavičku“ na N-konci a hypervariabilní „ocasovou“ doménu (C-konec), (obrázek 1-3).

α -helikální středová doména je důležitá především pro uspořádání neurofilament, kdežto variabilní „hlavička“ a „ocásek“ jsou zodpovědné za funkční vlastnosti, jako jsou např. interakce s různými proteiny. NF-L tvoří páteř, ke které se připojují středně těžké a těžké řetězce NF. Koncové části NF-M a NF-H tvoří postranní ramena, kterými se spojují s přiléhajícími neurofilamenty a mikrotubuly (97, 98), (obrázek 1-4).



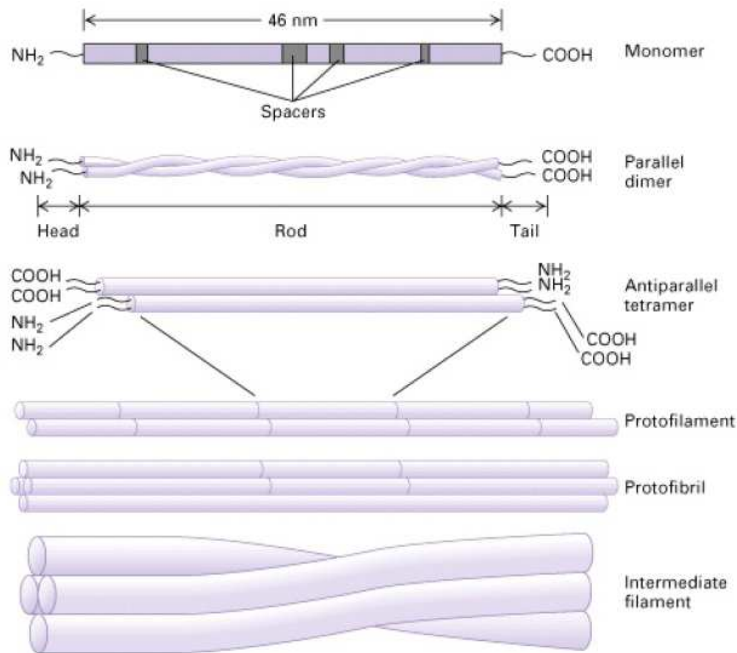
Obrázek 1-3: Podjednotky neurofilament – struktura (převzato a upraveno (97)).

Na obrázku je vidět, že všechny podjednotky NF mají vysoce konzervativní strukturu centrální oblasti, vysoká variabilita je v C- a N-koncové doméně. Zvláště střední a těžké podjednotky NF mají na svém C-konci mnohočetná opakování sekvence Lys-Ser-Pro (KSP). Jedná se o fosforylační místa těchto proteinů s neobvykle vysokým podílem serinových zbytků.



Obrázek 1-4: Cytoskeletální síť - schéma propojení mikrotubulů, intermediálních filament a mikrofilament (převzato a upraveno (98)).

Uspořádání intermediárních filament do jejich konečné podoby pravděpodobně probíhá v pěti krocích. Polypeptidy se nejdříve obtácejí kolem sebe za vzniku dimerů. Ty se poté skládají antiparalelně a vytvářejí tetramery, protofilamenta a nakonec intermediární filamenta (98, 99), (obrázek 1-5). Podjednotky tripletu: NF-L, NF-M a NF-H kopolymerují v poměru 5 : 3 : 1. Vznikají tak filamenta se specifickým postranním větvením.



Obrázek 1-5: Struktura intermediárních filament a jejich uspořádání (převzato a upraveno (100)).

1.4.1.3 Fosforylace a funkce

Fosforylace je důležitá pro správnou funkci neurofilament (101). Kolem 80 % axonálních neurofilament je vysoce fosforylováno a pomocí příčných vazeb integrováno k axoskeletonu, za vzniku tzv. „statického poolu“. Zbývajících 20 % méně fosforylovaných NF tvoří tzv. „dynamický pool“. Protože však fosforylace ovlivňuje náboj postranních řetězců, předpokládá se, že právě jednou z funkcí fosforylace je nárůst repulsí (založených na náboji) sousedních filament, čímž vzrůstají inter-filamentové vzdálenosti a to má za následek zvětšení průměru axonů (99).

Nejsilněji fosforylovaným proteinem lidského mozku a pravděpodobně i celého lidského těla je těžký neurofilamentový řetězec NF-H. Fosforylace a defosforylace neurofilamentových proteinů je komplexní proces převážně regulovaný v axonální části a je zaměřen na různá akceptorová místa pro fosfát u NF podjednotek. NF-M a NF-H jsou silně postranslačně fosforylovány poté, co jsou transportovány z těla nervové buňky do axonu. Fosforylace neurofilament probíhá pozvolna a je regulována skupinou enzymů, převážně kináz (102, 103). Vazebná místa pro fosfát jsou u těchto proteinů uspořádána jako opakující se motivy sekvence Lys-Ser-Pro (tzv. KSP repetice); hlavně na C-konci „ocáskové“ domény NF-H, kde se nachází 42 KSP repetice.

Z fyziologického hlediska je velmi významný úzký vztah mezi průměrem axonů a vedením rychlosti. Poslední studie ukazují, že stupeň fosforylace nepřímo koreluje s rychlostí axonálního transportu (104).

Je také nutno zmínit, že k blokaci uspořádání NF stačí fosforylace NF-L hlavičkové domény (na Ser-55) nebo u NF-M (na Ser-44) proteinkinázou-A. Zatímco nefosforylované NF-H jsou s mikrotubuly pevně spojeny, pravděpodobně s pomocí tau-proteinu, fosforylace vede k disociaci z mikrotubulů (97, 105). Fosforylovaná forma NF-H je vůči proteázám odolnější, zatímco nejmenší a nejvíce rozpustná podjednotka NF-L je na štěpení proteázami velmi citlivá (97).

1.4.1.4 Degradace neurofilament

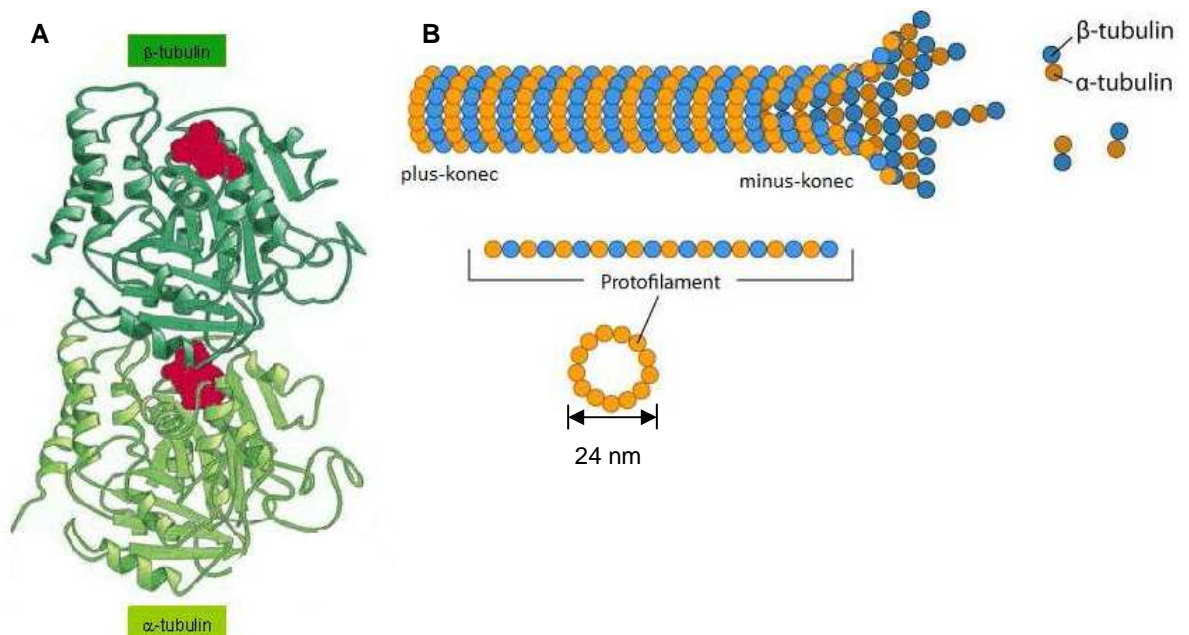
Rozpad neurofilament je závislý na proteolytickém štěpení. Předpokládá se, že NF se rozpadají, když opouštějí axonální zakončení. Za fyziologických podmínek je tento rozpad regulován kalmodulin-dependentní proteázou. Se vzrůstajícím stupněm fosforylace klesá „citlivost“ neurofilament ke štěpení proteázami.

Akumulace NF proteinů byla prokázána v řadě neurodegenerativních onemocnění, např. ALS, svalová atrofie, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova demence, axonální neuropatie a další.

Udává se, že „životnost“ neurofilament je kolem 1-2 let (na základě výpočtu rychlosti pohybu u lidského sedacího nervu 1-2 mm/den) (105). Proto se v neurofilamentech velmi pravděpodobně mohou hromadit poškození způsobená oxidativním stresem, zánětem apod., což může nakonec vést k narušení jejich uspořádání a nárůstu axonální patologie.

1.4.2 Mikrotubuly

V eukaryotních buňkách mají mikrotubuly zásadní organizující funkci. Základní stavební jednotkou mikrotubulů je heterodimer dvou globulárních proteinů α - a β -tubulinu, každý o molekulové hmotnosti 55 kDa. Každý mikrotubulus se skládá z 13 paralelních protofilament (což je řetěz tubulinových podjednotek poskládaných za sebou), kde se postupně střídají α - a β -molekuly tubulinu. To podmiňuje polární strukturu jednotlivých protofilament a současně i celého mikrotubulu (s α -tubulinem na *minus*-konci a β -tubulinem na *plus*-konci). Na (+)-konci probíhá polymerace mnohem rychleji než na (-)-konci, proto mikrotubuly rostou od *minus*-konce k *plus*-konci (obrázek 1-6). Polarita má také zásadní význam pro formování a funkci mikrotubulů, např. určování směru transportu uvnitř buňky (106). Energetickým zdrojem polymerace je hydrolyza GTP vázaného na tubulin.



Obrázek 1-6: Struktura mikrotubulu – (A) molekula tubulinu (dimer podjednotek α - a β -tubulinu). (B) skladba mikrotubulu ze 13 paralelních protofilament (převzato a upraveno z (94)).

V eukaryotních buňkách dochází k expresi několika izotypů obou tubulinových podjednotek, které jsou kódovány četnou rodinou genů (106, 107). U obratlovců existuje sedm izoform β -tubulinu, které byly identifikovány na základě rozdílné sekvence 15 AMK jinak vysoce konzervativní C-koncové domény a jsou specifické pro určité tkáně (108, 109). Pro neuronální tkáň je specifický β -tubulin třídy III. Výjimkou neuron-specifické povahy β -III tubulinu je zvýšená exprese této izoformy v některých nádorových buňkách (110, 111).

Mikrotubuly v buňce vyrůstají ze specializovaných organizačních center (mikrotubuly organizující centrum – MTOC), tzv. centrozomů (106).

Mikrotubuly nikdy nepracují osamoceně. Jejich funkce závisí na velkém množství proteinů, které se k nim váží. Tzv. s mikrotubuly asociované proteiny (MAPs) propojují mikrotubuly mezi sebou, nebo s mikrofilamenty, středními filamenti, zajišťují interakce s buněčnými organelami a plazmatickou membránou. Ovlivňují rychlost polymerace mikrotubulů.

Výběžky neuronů se dají považovat za zvláštní strukturu, na které se podílejí především mikrotubuly. Neuronální tkáň je ze všech živočišných tkání nejbohatší na tubulin, protože axony a dendrity jsou plné mikrotubulárních svazků. Tubulin tvoří 20 % mozkových proteinů (112). V nervových buňkách směřují všechny mikrotubuly v axonu stejným směrem; svými *plus*-konci k axonovému zakončení. Orientované mikrotubuly vytvářejí systém drah pro směrování transportu látek, které jsou syntetizovány v těle buňky a jsou potřebné v axonovém zakončení (např. membránové proteiny důležité pro růst axonů, proteiny určené k sekreci a vyrobené v těle buňky, membránové váčky, synaptické měchýřky, organely či další buněčné komponenty). V opačném směru přepravují např. „staré“ membrány k jejich následné degradaci v lysozomech v těle buňky, růstové faktory a jejich receptory. Tento transport, který zde v případě axonů překonává délku i několika metrů, je umožněn díky molekulovým motorům (104, 113).

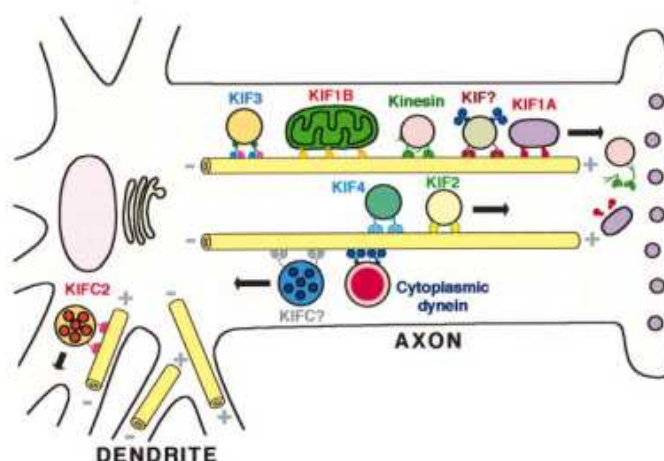
1.5 Axonální transport a molekulové motory

Neurofilamenta jsou přenášena pomocí axonálního transportu rychlostí 0,25–3 mm/den, což je mnohem méně, než je pohyb za pomoci molekulových motorů (105). Molekulové motory jsou bílkoviny vázané k mikrotubulům. Přeměňují energii získanou z hydrolýzy ATP v mechanický pohyb. Mají jednak vazebné místo pro tubulin, ale i schopnost vázat se na povrch membrán.

Syntéza důležitých proteinů probíhá pouze v těle nervové buňky. Látky potřebné pro výživu a funkci axonů a synapsí tedy musejí být do axonů transportovány. Rozlišují se dva typy axonálního transportu – rychlý a pomalý axonální transport.

Rychlý transport je zodpovědný za pohyb membránových organel (rychlostí přibližně 50-200 mm za den) jak směrem k synapsím (antegrádní transport) tak i zpět k tělu buňky (retrográdní transport). Naproti tomu za pohyb cytoskeletálních proteinů a enzymů důležitých pro vývoj a vyživování neuronů je zodpovědný pomalý transport (114, 115). Antegrádní transport probíhá za pomoci velké rodiny kinesinových proteinů. Jedná se o proteiny pohybující se k *plus*-konci mikrotubulů. Retrográdního transportu, směrem zpět k tělu buňky (*minus*-konec), se účastní dyneiny.

Molekulové motory využívají k transportu nákladu podél drah v cytoplazmě, vytyčených mikrotubuly a aktinovými vlákny, energii uvolňovanou během hydrolýzy ATP (obrázek 1-7).



Obrázek 1-7: Rodina kinesinů a cytoplazmatický dynein – transport organel podél mikrotubulů v axonu (převzato a upraveno z (113)).

Způsob, jakým jsou neurofilamenta transportována, zůstává stále otázkou k diskuzím. Pro tento transport existují dva modely. „Model podjednotek“, kdy NF jsou rozloženy na jednotlivé podjednotky či malé oligomery těsně před transportem. Druhým modelem je „model polymerů“, který připouští transport NF ve formě intaktních (celých a neporušených) filament (116).

Z dosavadních studií byl prokázán jak pohyb neporušených filament, což by silně podpořilo teorii polymerního modelu, tak i filamentových částec při studiu neurofilament a vimetinu (117-120).

1.6 Vlastní cytoskeletální antigeny u pacientů s RS a ALS

Podjednotky neurofilament se aktivně účastní v patogenezi axonálního poškození a degenerace jednak jako původci onemocnění a jednak slouží jako markery progresse onemocnění (121).

Vysoce fosforylované podjednotky neurofilament NF-H se za normálních podmínek nacházejí pouze v axonech neuronů, jako součást neurofilamentového tripletu a je možné využít těžké podjednotky jako markeru ukazujícího na axonální poškození nebo degeneraci. Fosforylace NF-H může být zvýšená u pacientů s primárně či sekundárně progresivní fází RS (122).

NF-L jsou součástí jen malé části těla nervových buněk a dendritů ve srovnání s axony (123, 124). Lehké podjednotky neurofilament se mohou z parenchymu nervových buněk uvolňovat do mozkomíšního moku dříve než podjednotky těžké díky své menší molekulové hmotnosti a nižšímu stupni fosforylace a také mohou být rychleji degradovány (97, 125).

I když by se mohlo předpokládat, že poruchy hematoencefalické bariéry by mohly ovlivňovat koncentraci NF-L v mozkomíšním moku, je tento vliv pouze zanedbatelný (124). U zdravých jedinců nejsou hodnoty NF-L v moku měřitelné, zatímco většina osob s určitými neurologickými poruchami, např. ALS, cévní mozkové příhody, RS či Alzheimerova choroba, může mít tyto hladiny zvýšené (5). Některé studie také ukázaly zvýšení NF-L v moku u pacientů s RS nebo s CIS a také u těch, kteří do 3 let konvertovali k diagnostikované RS (40). Zvýšené hladiny NF-L v moku byly také pozorovány v době akutního relapsu, u pacientů s potvrzenými lézemi na MRI a stejně tak u pacientů s vyšším počtem relapsů (40, 124). Byly také sledovány hladiny

NF-L v závislosti na průběhu, zhoršení stavu a po atace RS. Hodnoty byly zprvu vysoké, během 1-2 měsíců pak docházelo k jejich poklesu (124). Mezi hladinou NF-L a mírou invalidizace určené pomocí EDSS nebyl nalezen konzistentní vztah. Některé studie vazbu prokázaly (121, 124), jiné nikoli (126). Norgren a kol. popsali významné korelace zvýšených hladin NF-L v moku s progresí onemocnění RS (127). Koncentrace NF-L nezávisí na věku, pohlaví či na délce trvání choroby (126-128). Konverze onemocnění z relaps-remitující formy RS do sekundárně progresivní RS je pravděpodobnější u případu vysokých hladin NF-L v moku (ve srovnání s hladinami, které jsou sotva detekovatelné) (129).

Hladiny NF-M zatím nebyly u pacientů s RS sledovány. Hladiny fosforylovaných a vysoce fosforylovaných forem NF-H (NF-H_{SM135} a NF-H_{SM134}) byly ve srovnání s kontrolami značně zvýšeny nejen u pacientů s CIS, ale také u pacientů s optickou neuritidou, jako jedním z příznaků RS (130, 131). Zvýšení bylo také pozorováno u pacientů s RS, avšak nebyly pozorovány žádné rozdíly v hladinách NF-H v moku u jednotlivých forem onemocnění RS – primárně progresivní, sekundárně progresivní a relaps-remitentní (56, 128). V několika studiích byly potvrzeny významné korelace mezi hladinami NF-H v moku vzhledem k EDSS u pacientů s CIS i RS (122, 125, 132). Bylo také zjištěno, že stupeň fosforylace neurofilament (poměr hyperfosforylovaných a fosforylovaných NF-H) byl 8krát vyšší u pacientů s těžkým postižením RS (97). Pro hodnoty NF-H v séru nebyly pozorovány žádné korelace s EDSS a nebyly také zjištěny žádné korelace s počtem relapsů (131). Nejvyšší hodnoty NF-H v moku byly nalezeny během relapsů (125, 132). Brettschneider a kol. ukázali, že vhodnou kombinací hodnot MRI a hladin NF-H v moku se dá zvýšit jinak nízká možnost předpovědi přechodu z CIS do klinicky definitivní RS (132). Na základě 3letého sledování pacientů bylo pozorováno zvýšení NF-H v moku u pacientů s chronickou primární nebo sekundární progresí RS než u pacientů v relaps-remitující fázi (122). Vysoké hladiny NF-L nebo NF-H v mozkomíšním moku by tedy mohly být nepříznivým prognostickým znamením u RS.

Kromě neurofilament hrají v axonálním cytoskeletu důležitou roli také mikrotubuly. Zvláště pak α - a β -podjednotky tubulinu a s mikrotubuly asociované proteiny MAPs (40, 56, 133). Zvýšené hladiny tubulinu v mozkomíšním moku byly zjištěny u pacientů s primárně i sekundárně progresivní formou RS ve srovnání s relaps-remitující RS a skupinou kontrol (121).

U ALS není do dnešní doby znám žádný specifický marker vhodný pro diagnostiku tohoto onemocnění. Některé studie se tak zabývají hledáním a analýzou proteinů mozkomíšního moku, které by mohly hrát roli v diagnostice ALS (68, 134, 135). Obecně platí, že tyto studie ukázaly na zvýšené hladiny neurofilament a tau-proteinu v mozkomíšním moku pacientů s ALS. Avšak pro klinickou praxi je důležité rozlišovat mezi onemocněním ALS a poruchami, které ALS pouze připomínají. Reijn a kol. zjistili (134), že u pacientů s ALS byly významně zvýšeny pouze hladiny NF-L a NF-H. Ostatní sledované markery – tau, fosfo-tau, S100 protein, MBP a β -amyloid žádné signifikance nevykazovaly. Velmi slabé korelace byly pozorovány mezi délkou trvání nemoci a hladinami MBP, NF-L a NF-H.

1.7 Protilátky proti neuronálním antigenům

Jak již bylo zmíněno v úvodu, roztroušená skleróza je autoimunitní onemocnění, při kterém dochází k poškození nervové tkáně odbouráváním myelinu a následně k rozpadu axonů. Tím dochází k uvolňování strukturálních částí cytoskeletu, jako jsou právě neurofilamenta, tubulin, tau-protein a další proteiny asociované s mikrotubuly. Stanovování autoprotilátek proti těmto strukturám slouží jako marker axonálního poškození.

Podrobněji se zmíním o anti-myelinových protilátkách a protilátkách proti neurocytoskeletálním strukturám.

1.7.1 Antimyelinové protilátky

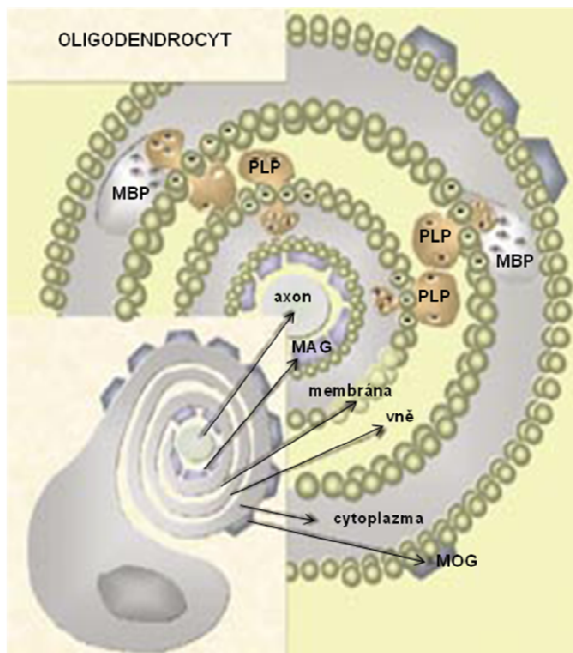
Možnými terči autoreaktivních T-lymfocytů u onemocnění RS jsou součásti obalů axonů, myelinové nebo oligodendrocytární proteiny. Hlavními proteiny autoimunitní imunopatologické reakce jsou: myelinový bazický protein, proteolipidový protein, myelinový oligodendrocytární glykoprotein a glykoprotein asociovaný s myelinem (obrázek 1-8).

Myelinový bazický protein (MBP), který je pokládán za hlavní autoantigen v patogenezi RS, tvoří největší podíl mezi myelinovými proteiny v CNS, asi 30 %. Dlouhou dobu byl v popředí zájmu ve spojení s EAE. Aminokyselinová sekvence tohoto proteinu je u většiny živočišných druhů obdobná a molekulová hmotnost je okolo 18 500 Da (136). MBP je lokalizován na cytoplazmatické straně myelinové

vrstvy. U tohoto proteinu byly prokázány shody v AMK sekvenci na pozicích 84-101 např. se sekvencemi hemaglutininu viru chřipky, polymerázou HBV, proteiny virů spalniček a EBV. Je tedy zajímavé, že k indukci onemocnění stačí shoda jen v několika aminokyselinách proteinu MBP.

Dalším slibným antigenním kandidátem je myelinový oligodendrocytární glykoprotein (MOG). Původně byl identifikován jako hlavní cíl demyelinizační protilátkové odpovědi u experimentální autoimunitní encefalomyelitidy vyvolané imunizací tkáňovými homogenáty CNS (4, 43). Tvoří sice nepatrnou část myelinových proteinů, avšak tento glykoprotein je pro myelin specifický. Vyskytuje se pouze na vnější straně myelinové pochvy a plazmatické membrány oligodendrocytu a je silně imunogenní. Jako jediný z těchto proteinů má na svém povrchu motiv (doménu) podobný imunoglobulinu a poskytuje cíl pro protilátky přítomné v extracelulárním prostoru. Tato doména je unikátní v tom, že obsahuje encefalitogenní T-buněčné epitopy, které vyvolávají EAE u potkanů, myší a kosmanů (35, 137, 138). Patologie těchto zvířecích modelů se silně podobá průběhu RS u lidí. Ačkoli byly tedy popsány zvýšené hladiny protilátek proti MOG u pacientů s RS, jejich úloha v patogenezi onemocnění zůstává stále nejasná (139). Zejména nejsou dostupné informace týkající se četnosti nebo titru hladiny protilátkové odpovědi proti extracelulární doméně MOG-Ig, která je cílem patogenní odpovědi na tento antigen.

Funkčně významné molekuly v buňce jsou často součástí nadmolekulárních komplexů. Obdobně membránové molekuly nejsou izolovány, ale jsou funkčně propojeny s dalšími strukturami povrchu buňky. Při imunopatologické autoimunitní reakci tak dochází k rozšiřování reaktivity původně namířené proti MBP i vůči MAG, MOG a PLP, který je transmembránovým proteinem, jehož negativně nabitý konec je v extracelulárním prostoru a kladně nabitá část směřuje do cytoplazmy. Imunopatologické procesy tak mají zesilující potenciál a po prolomení tolerance vlastních struktur zasahují další terče a nakonec se projevují klinicky zřetelným poškozením.



Obrázek 1-8: Schematické znázornění hlavních proteinů (autoantigenů) myelinových obalů (převzato a upraveno (43)).

1.7.2 Antiaxonální protilátky

Přítomnost protilátek proti neurofilamentům byla studována a popsána u řady onemocnění. Toto by mohlo mít zejména význam u chronických onemocnění, kde axonální degenerace vede k neustálému uvolňování neurofilament a tím dochází ke stimulaci imunitního systému.

Protilátky proti NF byly nalezeny nejen u pacientů s RS, ale i u pacientů s revmatoidní artritidou, neuropatií a ALS (128).

Axonální poškození a následné uvolňování neurofilament by mohlo vést k sekundární imunitní odpovědi závislé na T-buňkách, jako odpověď na cizí antigen (140). Části cytoskeletu a myelinu uvolňované z neuronů jsou odstraňovány makrofágy, které putují směrem k periferním lymfatickým uzlinám (56). Mimo to mohou protilátky proti neurofilamentům vznikat na základě kontaktu s cizorodými (exogenními) antigeny, např. virovými peptidy s podobnou aminokyselinovou sekvencí nebo mohou následně zkříženě reagovat s neuronálními antigeny (141). Autoimunitní reakce mířené proti vlastním antigenům nervových buněk se mohou podílet na axonálním poškození a trvalém postižení u RS (59), ale také mohou být jen průvodním jevem onemocnění (141, 142).

1.7.3 Autoprotilátky proti cytoskeletálním proteinům u různých neurodegenerativních onemocnění

Protilátky proti cytoskeletálním proteinům u různých neurologických onemocnění byly popsány v několika pracích (128, 142-148).

V našich studiích jsme zjistili, že intratekální syntéza imunoglobulinů IgG a IgM anti-NF-L protilátek se mezi podskupinami pacientů s RS (RR, SP, nebo PP), nebo mezi pacienty s CIS a RS ve srovnání s kontrolami nijak neliší (142). Na druhou stranu, intratekální syntéza protilátek anti-NF-L IgG koreluje s MRI daty naměřenými pro mozkové atrofie (128). Bylo také zjištěno, že hladiny anti-NF-L protilátek třídy IgG v séru byly výrazně zvýšené u pacientů s primárně-progresivní formou RS ve srovnání s kontrolní skupinou pacientů s různými neurologickými onemocněními nebo zdravých kontrol (149). Některé studie dokonce potvrdily významné korelace anti-NF-L IgG indexů v séru i mozkomíšním moku vzhledem k hodnocení pomocí EDSS nebo MSSS (148, 150). Nebyly však potvrzeny korelace anti-NF-L protilátek vzhledem k věku nebo době trvání onemocnění s EDSS (128, 149). I když někteří autoři ukazují jak korelace mezi protilátkovými indexy anti-NF-L IgG, tak hladinou anti-NF-L IgG protilátek v mozkomíšním moku a dobou trvání před diagnózou onemocnění a LP (148). Zvýšená intratekální syntéza protilátek proti NF-L byla popsána u pacientů s progresivní formou RS. U pacientů s RS byl také popsán vzájemný vztah mezi markery atrofie mozku a intratekální syntézou anti-NF-L protilátek IgG (151). Zvýšená hladina protilátek proti NF-L byla zjištěna u pacientů s primárně progresivní formou RS (149).

Ohledně anti-NF-M protilátek bylo zjištěno, že intratekální syntéza imunoglobulinů třídy IgM a IgG byla významně zvýšena v rámci všech podskupin pacientů s RS ve srovnání s kontrolní skupinou pacientů s různými neurologickými onemocněními nebo u zdravých kontrol (143). Samotná hladina anti-NF-M protilátek však nekoreluje s žádným klinickým projevem onemocnění RS (143). Byla tak ukázána korelace mezi intratekální syntézou anti-NF-M protilátek třídy IgG a průběhem onemocnění, ale nebyly pozorovány žádné korelace mezi intratekální syntézou těchto protilátek vzhledem k věku, pohlaví, délce trvání onemocnění a EDSS (143, 150). V nedávných studiích byla pozorována zvýšená intratekální produkce protilátek proti NF-M u pacientů s RS (143), ale ne u případu protilátek proti NF-L (142, 143).

U studie protilátek proti těžkým řetězcům neurofilament v séru i moku pacientů s RS byly nalezeny obdobné hladiny těchto protilátek v rámci všech sledovaných skupin

pacientů (RR, PP, SP a RS) (148). Zajímavostí je, že dle studie, kterou prováděli Silber a kol., by hladiny anti-NF-H protilátek v moku měly ukazovat souvislost s dobou trvání onemocnění před LP a vzhledem k EDSS (148), avšak jiné výzkumné skupiny žádnou takovouto korelaci s EDSS neprokázaly (128, 131, 132).

Anti-tubulinové protilátky pak byly zvýšeny u pacientů s RS (152), ale ne vždy byla tato pozorování dalšími studii potvrzena (148). Silber a kol. (148) sice ve své studii ukázal na významné korelace anti-tubulinových protilátek v mozkomíšním moku a indexu anti-tubulinových protilátek MMM/sérum vzhledem k EDSS, kdežto naše pokusy nic takového neukázaly (150, 152). Nebyly také dokázány žádné korelace anti-tubulinových protilátek v souvislosti s věkem či délkou trvání onemocnění (148, 152). Zvýšená produkce protilátek proti tubulinu je pozorována jak u neurodegenerativního onemocnění, tak u mozkového traumatu (133, 144, 147). Korelační vztahy těchto protilátek však byly prozkoumány velmi okrajově (148, 153).

1.7.4 Protilátky u pacientů s ALS

U pacientů s ALS se hledají vhodné markery, jak v mozkomíšním moku tak séru pacientů, ve snaze pochopit patogenezi onemocnění (68, 154, 155).

Vztah mezi přítomností autoprotilátek u ALS a poškozením neuronů není objasněn. Zatím nebyl prokázán žádný antigen ani protilátka, které by byly specifické pro ALS. První známky svědčící o autoimunitních mechanismech u ALS pocházejí z experimentálních modelů Engelhardta a kol. (156). Autoimunitní teorie vycházela z pozorování, že sérum pacientů s ALS ve tkáňové kultuře poškozuje axony motoneuronů (157). Autoimunitní humorální odpověď může vznikat díky uvolňování cytoskeletálních proteinů v důsledku poruchy motoneuronu a následné tvorbě protilátek proti nim.

Některé protilátky, detekované s různou četností výskytu, jsou spojené s určitým typem onemocnění ALS. Jedná se o protilátky proti gangliosidům (158), proti Ca⁺ kanálům (159), proti neurofilamentovému tripletu (146, 147), proti Fas proteinu (160), proti tubulinu, kyselému gliovému fibrilárnímu proteinu (GFAP), β-amyloidu, S100 a tau-proteinu (147) a proti receptorům acetylcholinu (156, 161). Protilátky proti neuronálním antigenům byly, ve většině studií, detekovány v séru. Změny profilu autoprotilátek v mozkomíšním moku pacientů s ALS zatím popsány nebyly (147, 162, 163).

Sérové protilátky proti NF velmi často detekované u pacientů s ALS (146) byly též zvýšeny u pacientů po cévní mozkové příhodě (164). Autoprotilátky proti neurofilamentům v MMM a séru ALS pacientů již byly popsány dříve (146, 147).

2 Cíle výzkumné práce

Axonální poškození, obecně u neurodegenerativních chorob, postihuje difúzně mozek a míchu již od časných stádií onemocnění. Při axonálním přerušení dochází nejen k poškozování, ale i degeneraci, což by mohlo vést k uvolňování neurofilament a dalších strukturních částí cytoskeletu. Typickými cytoskeletálními bílkovinami nervových buněk jsou neurofilamenta a pro neuronální tkáň specifický β -tubulin III. Vzhledem k autoimunitní povaze onemocnění RS a částečně i ALS se mohou vytvářet protilátky proti specifickým strukturám axonů. Protilátky proti těmto strukturám by se pak mohly podílet na dalším poškozování axonu. Otázkou zůstává, zda autoimunitní útok namířený proti těmto jinak skrytým antigenům může být provázen tvorbou protilátek jako vedlejší projev autodestrukčních procesů. Anti-cytoskeletální protilátky v séru a MMM u pacientů s RS či ALS bez ohledu na jejich primární nebo sekundární roli tak obecně mohou odrážet axonální patologii. Z důvodu, že vzájemné korelace mezi anti-cytoskeletálními protilátkami byly prozkoumány jen okrajově (148, 153), jsem se v této studii zaměřila na přítomnost protilátek proti NF-L, NF-M u pacientů s ALS. U pacientů s RS jsem studovala anti-tubulinové protilátky. Anti-NF protilátky byly analyzovány v našich předchozích studiích (142, 143, 150).

Cílem naší studie bylo:

1. zhodnocení protilátek proti lehké a střední podjednotce neurofilament v séru a mozkomíšním moku pacientů s ALS. Dále nás zajímala jak souvislost mezi anti-NF-L a anti-NF-M protilátkami v séru a MMM, tak současně mezi dvěma druhy anti-NF protilátek navzájem.
2. zhodnocení protilátek proti tubulinu v séru a mozkomíšním moku u pacientů s RS. Během této studie byly sledovány různé populace anti-tubulinových protilátek třídy IgG a porovnávaly se dvě různé ELISA metody.
3. testování dvou odlišných druhů antigenů – hovězí tubulin a syntetický oktapeptid tubulinu s AMK sekvencí specifickou pro neuronální lidský tubulin (třída III β -tubulin). Pokusila jsem se ověřit, existuje-li nějaký vztah mezi anti-TU a anti-TUs protilátkami. Snahou pak bylo zjistit, zda se nějak liší protilátkové odpovědi v séru a MMM a také odhadnout podíl neuron-specifických protilátek proti tubulinu vůči celému spektru anti-tubulinových protilátek a jejich intratekální syntézy. Snažila jsem se tak zhodnotit význam protilátek proti tubulinu pro klinické účely a to zejména u pacientů s RS.

3 Metodika a soubory pacientů

3.1 Materiál

Chemikálie:

- azid sodný (Merck, Německo)
- hovězí sérový albumin (BSA), lyofilizovaný (Sevapharma a. s., ČR)
- hovězí sérum (farma Uherčice-ZVOS Hustopeče a. s., ČR)
- dihydrogenfosforečnan draselný (p.a., Lachema, ČR)
- G-PEM purf (80 mmol·l⁻¹ PIPES, 1 mmol·l⁻¹ MgCl₂, 1 mmol·l⁻¹ EGTA, 1 mmol·l⁻¹ GTP, pH 6,8. VIDIA spol. s r. o., ČR)
- hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát (p.a., Penta, ČR)
- hydrogenuhličitan sodný (p.a., Lachema, ČR)
- chlorid draselný (p.a., Lachema, ČR)
- chlorid sodný (p.a., Lachema, ČR)
- kyselina sírová (96% p.a., Penta)
- thimerosal (thiomersal) (MP Biomedicals Inc., Francie)
- TMB-Complete (chromogenní substrátový roztok 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu s peroxidem vodíku a stabilizátory pro detekci peroxidázové aktivity. Test-Line, s. r. o., ČR)
- Tween 20 (Carl Roth GmbH, Německo)

Antigeny, konjugáty a ostatní materiál:

- neurofilamenta – antigeny NF-L (68 kDa) a NF-M (160 kDa) izolované z hovězích mozků, lyofilizované, čistota > 98% dle SDS-PAGE elektroforézy (Progen Biotechnik, Německo)
- tubulin (z hovězího mozku), lyofilizovaný; čistota > 99% dle SDS-PAGE elektroforézy (Cytoskeleton, USA)
- konjugát SwAHu/IgG HRP - Prasečí protilátky proti lidskému IgG značené křenovou peroxidázou (Sevapharma, ČR). Po zániku Sevapharmy, konjugát nahrazen: GoAHu/IgG HRP - Kozí imunoglobuliny proti lidskému IgG značené křenovou peroxidázou (SouthernBiotech, USA)

- ELISA-VIDITEST human anti- β III Tubulin IgG – komerčně dostupná ELISA souprava pro stanovení protilátek proti β -III-tubulinu třídy IgG v séru a mozkomíšním moku (VIDIA spol. s r. o., ČR)
- stripy – individuálně vyjímatelné 8stripy v rámečku formátu 96jamkové destičky. ImmunoTM Modules, MaxiSorp (NUNC A/S, Dánsko)
- filtrační systém Nalgene, série MF75TM, PES (NALGENE Labware, USA)

Roztoky:

Fyziologický roztok (PBS), pH 7,2: 8,0 g NaCl
0,2 g KCl
0,2 g KH₂PO₄
2,9 g Na₂HPO₄·12 H₂O
doplnit do 1000 ml destilovanou vodou
a upravit pH na hodnotu 7,2

Ředící roztok: 1% BSA v PBS

Ředící roztok pro konjugát: 10% roztok hovězího séra v PBS
(6 ml hovězího séra + 54 ml PBS)

Pracovní roztok konjugátu: konjugát SwAHu/IgG HRP byl před použitím ředěn 5000× ředícím roztokem pro konjugát. Konjugát GoAHu/IgG HRP byl před použitím ředěn 4000×.

Promývací roztok: 117,0 g NaCl
0,1 g Thiomersal
10,0 g Tween 20
doplnit do 1000 ml destilovanou vodou.

Připravený zásobní roztok se filtruje do sterilních lahví. Filtrační systém Nalgene. Takto připravený roztok je koncentrovaný. Před použitím nutno naředit 20×.

Zastavovací roztok (2 mol·l⁻¹ kyselina sírová): 5,6 ml H₂SO₄ doplnit do 50 ml destilovanou vodou.

Vazebný roztok: 21 g NaHCO₃
0,25 g azid sodný
doplnit do 250 ml destilovanou vodou

Hodnota pH by měla být 9,1-9,2. Případná úprava pH se provádí roztokem 5 mol·l⁻¹ NaOH. Takto připravený zásobní roztok je koncentrovaný. Před použitím nutno naředit 100×.

3.2 *Přístroje*

Pevné vzorky byly váženy na analytických vahách APX-153 (Denver Instrument, Německo).

Pro měření a úpravu pH byl použit pH-metr Conductometer OK-104 (Radelkis, Maďarsko).

Promývání mikrotitračních destiček bylo prováděno pomocí ruční promývačky Nunc-ImmunoTM Wash 8 (NUNC, Dánsko).

Absorbance byla měřena při 450 nm a 620 nm na destičkovém spektrofotometru Sunrise (TECAN, Švýcarsko). Pro ovládání spektrofotometru z počítače a vyhodnocení naměřených dat byl použit software Magellan.

Koncentrace albuminu a celkových imunoglobulinů třídy G (IgG) v séru a mozkomíšním moku byly měřeny imunonefelometricky na analyzátoru IMAGE (Beckman Coulter, Immunotech, USA).

Destičky byly inkubovány v termostatu Incubat[®] 85 Melag (Melag, Německo)

3.3 *Statistika*

Ke statistickému zpracování dat byl použit program Statistica (StatSoft, ČR). Nejdříve byla zjištěna distribuce dat a vzhledem k nenormálnímu rozložení byly použity neparametrické testy. Rozdíly mezi skupinami byly posuzovány testem Kruskal-Wallis a následně Mann-Whitneyho U testem. Vztahy mezi proměnnými (protilátkami) byly vyhodnocovány Spearmanovým korelačním koeficientem. Párový Wilcoxonův test byl

použit pro statistické analýzy opakovaných měření a pro porovnávání indexů ASI. Hladina významnosti byla u všech testů nastavena na $p < 0,05$.

3.4 Postup stanovení anti-cytoskeletálních protilátek

3.4.1 Příprava antigenů

250 μg jednotlivých lyofilizovaných antigenů NF-L a NF-M používaných k potažení jamek mikrotitračních destiček (stripů) bylo rozpuštěno v 200 μl destilované vody podle instrukcí dodaných výrobcem (celkový objem 250 μl). Výchozí koncentrace proteinů v takto získaných zásobních roztocích antigenů byla 1 mg/ml. Antigeny byly následně rozpipetovány do mikrozkušavek (typu Eppendorf) v objemu 20 μl NF-L. U NF-M byly alikvoty po 40 μl . Rekonstituované antigeny byly zamrazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a těsně před použitím rozpuštěny ve vazebném roztoku. V případě NF-L byla požadovaná koncentrace 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, u NF-M byla koncentrace 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Antigen tubulinu (250 μg), izolovaný z hovězího mozku, byl rozpuštěn v 50 μl G-PEM pufru (celkový objem 50 μl). Aby bylo zabráněno snadné polymeraci tubulinu, bylo potřeba mít G-PEM pufr řádně vychlazený a uchovávaný na ledu. Koncentrace tohoto zásobního roztoku byla 5 mg/ml. Alikvoty byly rozpipetovány po 13 μl a uchovávány při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Obdobně, před použitím byly rozředěny vazebným roztokem na koncentraci 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.4.2 Stanovení anti-cytoskeletálních protilátek - ELISA metoda

Protilátky proti antigenům NF-L a NF-M a protilátky proti tubulinu byly měřeny pomocí metody ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) popsané dříve (128, 146, 148). Pro naše potřeby jsem pracovní postup upravila.

Séra pacientů byla ředěna 400 \times ředícím roztokem. Stejný roztok byl použit i k blokování jednotlivých jamek a k přípravě kalibrační řady. Moky byly nanášeny neředěné.

Jednotlivé jamky mikrotitračních destiček (stripů) byly potaženy příslušným antigenem. Antigeny byly rozpuštěny ve vazebném hydrogenuhličitanovém pufru (pH 9,6), množství a koncentrace použitých antigenů jsou uvedeny v tabulce 3-1. Navazování probíhalo při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ přes noc. Destičky byly poté 1 hodinu blokovány při

laboratorní teplotě blokovacím roztokem v množství 200 µl/jamka. Následovalo promytí. Promývací krok byl opakován vždy 3×. Každá jamka byla naplněna 350-400 µl promývacího roztoku pomocí ruční promývačky. Takto naplněné jamky jsem před odsátím nechávala cca 30 sekund odstát. Po odsátí roztoku v posledním kroku promývacího cyklu bylo nutné důkladně odstranit zbytky promývacího roztoku vyklepáním do savého materiálu (buničitá vata). Poté bylo nanášeno 50 µl naředěných vzorků sér, moků (neředěný) a standard. Vše v duplikátech. Vzorky byly inkubovány 2 hodiny při 37 °C v termostatu. Po promytí bylo do všech jamek pipetováno 100 µl pracovního roztoku konjugátu a inkubovalo se opět v termostatu při 37 °C po dobu 90 minut. Barevná reakce vyvolaná přidáním 100 µl substrátu TMB probíhala 15-30 minut, podle intenzity vznikajícího modrého zbarvení. Inkubovalo se při laboratorní teplotě ve tmě (víčko destičky se zakrylo alobalem). Reakce byla poté zastavena přidáním 100 µl 2 mol·l⁻¹ H₂SO₄. Měření absorbance při 450 nm a 620 nm jako referenční vlnové délce bylo prováděno s minimální prodlevou po přidání stop činidla.

Vzorky séra a mozkomíšního moku od daného pacienta byly analyzovány vždy na téže destičce současně.

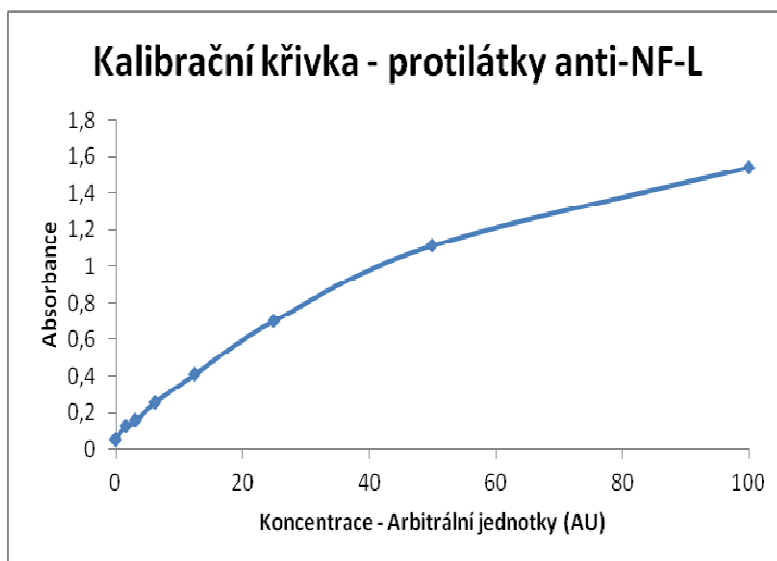
Jako kalibrační standard při jednotlivých stanoveních bylo použito směsné sérum. Směsné sérum jsem připravila smícháním několika vzorků sér pacientů, které jsem používala pro optimalizaci našeho ELISA postupu, a které vykazovaly zvýšené absorbance. Z takto získaného směsného séra jsem si připravila alikvoty o objemech 50 µl, které byly uchovávány při -70 °C. Ředěním geometrickou řadou jsem získala kalibrační křivku o osmi kalibračních bodech. Koncentrace nejvyšší standardy je definována jako 100 arbitrárních jednotek. Arbitrární jednotky pro jednotlivé vzorky sér a MMM pacientů a kontrolních skupin byly tedy zjištěny z kalibrační křivky; u sér musely být hodnoty vynásobeny ředícím faktorem 400. Na obrázku 3-1 (A, B, C) jsou znázorněny příklady kalibračních křivek protilátek proti danému antigenu.

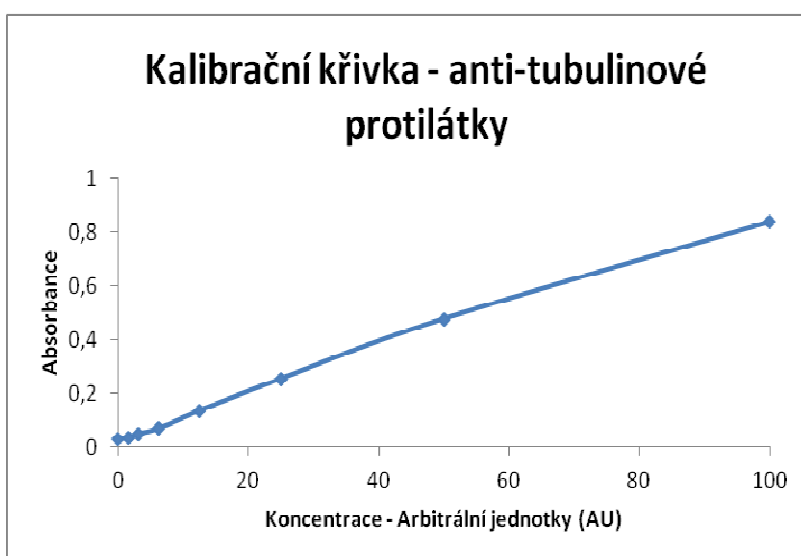
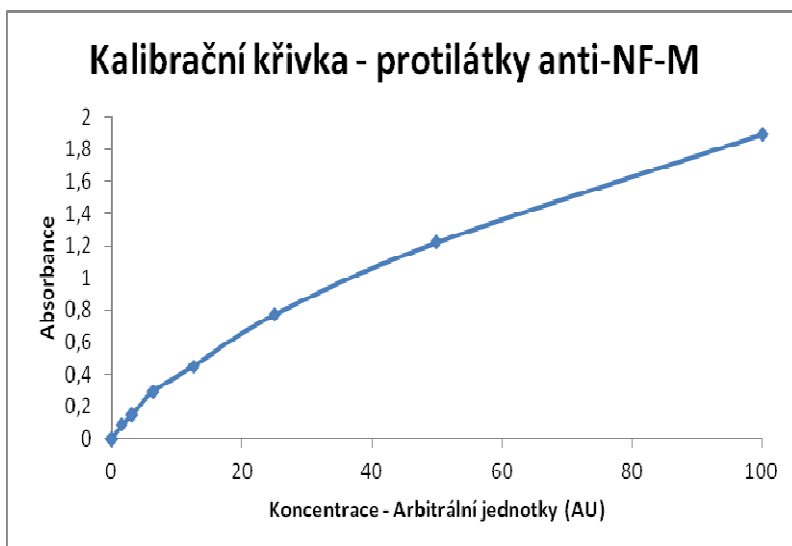
Tabulka 3-1: Přehled použitých antigenů

Antigen	NF-L	NF-M	Tubulin
koncentrace	2,5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml
objem na jamku	50 µl	50 µl	50 µl

Obrázek 3-1: Grafické znázornění kalibračních křivek protilátek proti jednotlivým typům antigenů

- (A) Kalibrační křivka protilátek proti lehké (NF-L) podjednotce neurofilament
- (B) Kalibrační křivka protilátek proti středně těžké (NF-M) podjednotce neurofilament
- (C) Kalibrační křivka protilátek proti tubulinu; hovězí tubulin.





3.4.3 ELISA-VIDITEST

Protilátky proti β III-tubulinu, specifickému pro neuronální buňky, byly měřeny pomocí komerčně dodávané ELISA soupravy (VIDIA spol. s r.o.). Jedná se o kvantitativní sendvičovou analýzu. Na povrchu jamek mikrotitrační destičky je navázán antigen – syntetický oktapeptid tubulinu se sekvencí aminokyselin (441-448 AMK) specifickou pro neuronální lidský tubulin. Neuronspecifická část tubulinu je na povrch jamek imobilizována pomocí cysteinového „spaceru“ na N-konci. AMK sekvence tohoto oktapeptidu (H-Cys-Glu-Ser-Glu-Ser-Gln-Gly-Pro-Lys-NH₂) odpovídá C-koncové sekvenci lidského β -tubulinu třídy III.

ELISA byla prováděna dle standardního postupu. Změna zbarvení měřená při 450 a 620 nm byla přímo úměrná množství anti-tubulinových protilátek v testovaných vzorcích.

Séra pacientů byla ředěna 100× ředícím roztokem pro sérum, mozkomíšní moky byly nanášeny neředěné.

Do příslušných jamek bylo pipetováno v duplikátech 100 µl kontrolních vzorků (pozitivní a negativní kontroly), sér a moků. Po inkubaci, která probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě a následném promytí, bylo do všech jamek pipetováno 100 µl konjugátu značeného peroxidázou (Px-konjugát). Inkubovalo se opět 1 hodinu při laboratorní teplotě. Promývací krok se opakoval vždy 4×. Promývací roztok bylo nutné vždy dokonale odsát a destičku vysušit poklepáním na čistý filtrační papír. Barevná reakce vyvolaná přidáním 100 µl substrátu TMB probíhala 10 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Víčko destičky bylo zakryto alobalem. Reakce byla poté zastavena přidáním 100 µl stop činidla. Měření absorbance při 450 nm a 620 nm jako referenční vlnové délce bylo prováděno s minimální prodlevou od zastavení reakce.

Vzorky séra a mozkomíšního moku od daného pacienta byly analyzovány vždy na téže destičce současně.

Výsledky byly vyjádřeny jako index (v), který byl vypočten podle vzorce: absorbance vzorku / cut-off hodnota. Cut-off hodnota byla určena vynásobením průměrných hodnot pozitivní kontroly korekčním faktorem (Kf). Kf byl výrobcem definován vždy pro danou šarži ELISA soupravy.

3.5 Soubory pacientů

A. Studie pacientů s RS

Anti-tubulinové protilátky byly analyzovány v MMM a séru 34 pacientů s RS a 30 kontrolních jedinců, kteří podstoupili lumbální punkci (LP) na základě rutinního diagnostického vyšetření (tabulka 4-1). Diagnóza klinicky potvrzené RS a typ průběhu onemocnění v době LP byly určeny podle daných kritérií (165, 166). Na tomto základě byli pacienti s roztroušenou sklerózou rozděleni do skupin podle formy onemocnění. Patnáct pacientů bylo klasifikováno jako relaps-remitující (RR), osm pacientů se sekundárně progresivní (SP) RS a šest pacientů s primárně progresivní (PP) formou RS. Pět pacientů mělo klinicky izolovaný syndrom (CIS) a splnilo kritéria pro časnou diagnostiku roztroušené sklerózy (15). Jedenáct pacientů s RS nebylo před LP léčeno,

dvanáct pacientů užívalo imunosupresivní léčbu (steroidy a/nebo azatioprin) a jedenáct pacientů bylo léčeno současně imunomodulačními preparáty (interferon beta nebo glatiramer acetát) a imunosupresivě. Míra invalidity u pacientů s RS byla hodnocena pomocí tzv. Kurtzkeho Expanded Disability Status Scale (167).

Kontrolní jedinci byli rozděleni do dvou základních skupin. Skupinu normálních osob (CN) tvořili pacienti s bolestmi hlavy (nespecifické, migrenózní), závratěmi, psychogenními či únavovými syndromy. Vyšetření a podrobné zhodnocení stavů pacientů však nepřineslo konkrétní vysvětlení pro jejich potíže. Pacienti s různými neurologickými onemocněními, jako jsou např. polyneuropatie, mozková mrtvice, meningitida nebo encefalitida, tvořili kontrolní skupinu označovanou CD.

B. Studie pacientů s ALS

Ve studii protilátek proti lehké a střední podjednotce neurofilamentového tripletu u pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou bylo analyzováno 38 párových vzorků sér a MMM a 20 párových vzorků od kontrolních jedinců. Diagnóza klinicky potvrzené ALS v době LP byla určena podle platných El Escoriálních kritérií (89, 90). Tato kritéria slouží především k odlišení dvou základních typů onemocnění ALS – končetinové a bulbární. Míra invalidity u pacientů s ALS byla hodnocena zkušeným neurologem pomocí stupnice Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS), která slouží jako neurologický skríninkový nástroj (168, 169). Na základě kombinací těchto hodnocení byli pacienti s ALS rozděleni do dvou podskupin: pacienti s bulbární formou onemocnění ALS (BO) a pacienti s končetinovým postižením (KO).

Kontrolní skupinu tvořilo 20 osob, které trpěly převážně nespecifickými bolestmi hlavy, vertebrogenními bolestivými syndromy, únavovým syndromem aj. Nebylo zde žádné podezření na strukturální změny, krvácení nebo zánět.

Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s účastí ve studii. Studii schválila Etická komise 3. LF UK v Praze. Vzorky sér a MMM byly do doby analýzy skladovány v mrazících boxech na -80 °C.

3.6 Stanovení základních biochemických markerů a výpočty

Koncentrace albuminu a celkových imunoglobulinů třídy G (IgG) u všech párových vzorků sér a MMM byly měřeny v Centrální biochemické laboratoři Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK, Praha s laskavou pomocí prim. Benákové. Koncentrace albuminu a celkových IgG v séru a MMM byla použita k výpočtu albuminového kvocientu (Q_{Alb}) a IgG indexu.

Q_{Alb} : Funkce hematolivorové bariéry byla hodnocena podle albuminového kvocientu Q_{Alb} , který bere v úvahu koncentraci albuminu v MMM a séru.

$$Q_{\text{Alb}} = \frac{\text{Alb}_{\text{MMM}}}{\text{Alb}_{\text{sérum}}}$$

Q_{Alb} se využívá k hodnocení míry poškození hematolivorové bariéry a k výpočtu intratekální syntézy imunoglobulinů. Albumin se v MMM netvoří, jeho syntéza probíhá v játrech a do MMM se dostává právě přes hematolivorovou bariéru. Albumin tvoří přibližně 57 % celkové bílkoviny v MMM. Zvýšená koncentrace albuminu je vždy známkou poruchy bariéry (170).

Fyziologická hodnota albuminu v MMM se pohybuje v rozmezí 112-354 mg/l (171, 172). Poměr albuminu v krvi k albuminu v moku závisí na věku a dobře koreluje s funkcí bariéry a cirkulací moku. U osob starších 13 let, lze závislost normálních hodnot Q_{Alb} na věku vyjádřit rovnicí: $Q_{\text{Alb}} \cdot 10^3 = 4 + (\text{věk}/15)$. Normální hodnoty Q_{Alb} jsou dány: do 15 let $\leq 5 \cdot 10^{-3}$, do 40 let $\leq 6,5 \cdot 10^{-3}$ a do 60 let $\leq 8 \cdot 10^{-3}$ (172). Poruchu funkce hematolivorové bariéry odvozenou od změn albuminového kvocientu lze rozdělit na lehkou, střední a těžkou. Za lehkou poruchu se považuje zvýšení Q_{Alb} (příslušného dle věku pacienta) o $1,5 \cdot 10^{-3}$, za střední poruchu zvýšení hodnoty Q_{Alb} do dvojnásobku hodnot normálu a za těžkou poruchu se považují hodnoty vyšší než dvojnásobek normální hodnoty.

Zvýšený Q_{Alb} se nachází u roztroušené sklerózy, chronické HIV-encefalitidy a u nezánettlivých polyneuropatií. Patologické hodnoty albuminového kvocientu se středně těžkou poruchou jsou pozorovány u virových encefalitid, chronických diabetických a hypertenzních encefalopatií a u ischemických malacií CNS. Těžká porucha hematolivorové bariéry byla prokázána u Guillain-Barrého syndromu, u bakteriálních meningitid, meningoencefalitid, encefalitid způsobených virem herpes

simplex, vaskulitid CNS, systémového lupusu erythematodes a u některých typů nádorů, kde záleží nejen na druhu nádoru, ale i na lokalizaci (170, 172).

IgG index: Od sedmdesátých let dvacátého století je známo, že koncentrace albuminu v MMM pozitivně koreluje s koncentrací imunoglobulinů IgG.

Imunoglobuliny mohou do mozkomíšního moku ve zvýšené míře prostupovat z krve při poruše hematolikorové bariéry, nebo mohou být produkovány přímo intratekálně při onemocněních CNS. Intratekální syntéza protilátek probíhá v perivaskulárně uložených B-lymfocytech, které se diferencují v plazmocyty. Míra, jakou do intratekálního prostoru prostupují imunoglobuliny z krve, závisí na stavu hematoencefalické bariéry. Je-li její funkce zachována nebo jen mírně poškozena, difundují skrze ni bílkoviny různou rychlostí dle své molekulové hmotnosti.

V roce 1972 zavedli Delpech a Lichtblau IgG-index. Vzorec, který zahrnuje poměry koncentrací IgG a albuminu v mozkomíšním moku i séru (172):

$$\text{IgG}_{\text{index}} = \frac{\text{IgG}_{\text{MMM}}}{\text{Alb}_{\text{MMM}}} \cdot \frac{\text{Alb}_{\text{sérum}}}{\text{IgG}_{\text{sérum}}}$$

Obvyklá hranice mezi normální a zvýšenou hodnotou odpovídající intratekální syntéze IgG v moku je 0,7. Referenční hodnoty používané pro hodnocení imunoglobulinového indexu jsou dány: IgG index < 0,54 nesvědčí pro intratekální syntézu IgG; IgG index v rozmezí 0,54-0,75 není vyloučena intratekální syntéza IgG; IgG index ukazuje pro intratekální syntézu IgG. Výhodou použití tohoto indexového systému je jeho jednoduchost, avšak systém je omezen na pacienty s normální nebo jen mírně porušenou funkcí hematolikorové bariéry.

K posouzení intratekální syntézy anti-tubulinových (anti-TU) protilátek třídy IgG byl použit tzv. specifický index protilátek (ASI) (147, 148, 170):

$$\frac{\frac{\text{anti-TU syntetický či bovinní v MMM}}{\text{anti-TU syntetický či bovinní v séru}}}{\frac{\text{celkové IgG v MMM}}{\text{celkové IgG v séru}}}$$

Hodnoty ASI $\geq 1,5$ indikují intratekální syntézu specifických protilátek.

Podíl neuron-specifických protilátek ke všem protilátkám proti tubulinu byl vyjádřen jako kvocient:

$$\frac{\text{anti-TU syntetický neuron-specifický oktapeptid tubulinu}}{\text{anti-TU hovězí tubulin}}$$

Tento podíl byl vypočten jak pro sérum (sérový kvocient), tak pro hodnoty v moku (MMM kvocient) vzhledem hladinám anti-tubulinových protilátek:

sérový kvocient:

$$\frac{\text{anti-TU syntetický oktapeptid tubulinu}_{\text{sérum}} * 100}{\text{anti-TU hovězí tubulin}_{\text{sérum}} * 400}$$

likvorový kvocient:

$$\frac{\text{anti-TU syntetický oktapeptid tubulinu}_{\text{MMM}}}{\text{anti-TU hovězí tubulin}_{\text{MMM}}}$$

Obdobně, k posouzení intratekální syntézy anti-neurofilamentových protilátek třídy IgG byl použit ASI ve tvaru (147):

$$\frac{\frac{\text{anti-NF(-L,-M)IgG v MMM}}{\text{anti-NF(-L,-M)IgG v séru}}}{\frac{\text{celkové IgG v MMM}}{\text{celkové IgG v séru}}}$$

4 Výsledky

Stanovení anti-tubulinových a anti-neurofilamentových protilátek bylo provedeno podle pracovních postupů uvedených výše (kapitola 3.4), které jsem zavedla v rámci mé disertační práce.

4.1 Protilátky proti tubulinu

Základní klinické údaje v mozkomíšním moku a séru jsou shrnuty v tabulce 4-1.

Tabulka 4-1: Klinické a laboratorní nálezy u pacientů s roztroušenou sklerózou

Skupiny pacientů	RS	CD	CN
Počet pacientů	34	13	17
Ženské pohlaví n (%)	19 (56)	12 (92)	15 (88)
Věk v době LP (roky)	39 (31 – 50)	46 (38 – 53)	36 (26 – 45)
Trvání choroby do doby LP (roky)	5,0 (3 – 13)	n.a.	n.a.
EDSS v době LP	3,5 (1,5 – 5,0)	n.a.	n.a.
Léčba			
žádná	11	n.a.	n.a.
pouze imunosupresivní	12	n.a.	n.a.
imunosupresivní a imunomodulační	11	n.a.	n.a.
IgG index	0,81 (0,6-1,13)	0,52 (0,47-0,58)	0,51 (0,49-0,60)

Hodnoty jsou uvedeny jako počet nebo medián (rozsah, 25. a 75. percentil).

n = počet; RS = roztroušená skleróza; CD = kontrolní skupina, pacienti s různými neurologickými onemocněními; CN = normální kontrolní jedinci; EDSS = Expanded Disability Status Scale; LP = lumbální punkce; IgG = imunoglobulin; imunosupresivní léčba = steroidy nebo azatioprin nebo obojí; imunomodulační léčba = interferon-beta nebo glatiramer acetát; n.a. = data nejsou známa; IgG index = (IgG v MMM/IgG v séru) / (albumin v MMM/albumin v séru), ukazující intratekální syntézu IgG. Patologické hodnoty jsou nad 0,7.

4.1.1 Zhodnocení protilátek

4.1.1.1 Vztah mezi hladinami anti-tubulinových protilátek v závislosti na použitém antigenu v séru a mozkomíšním moku

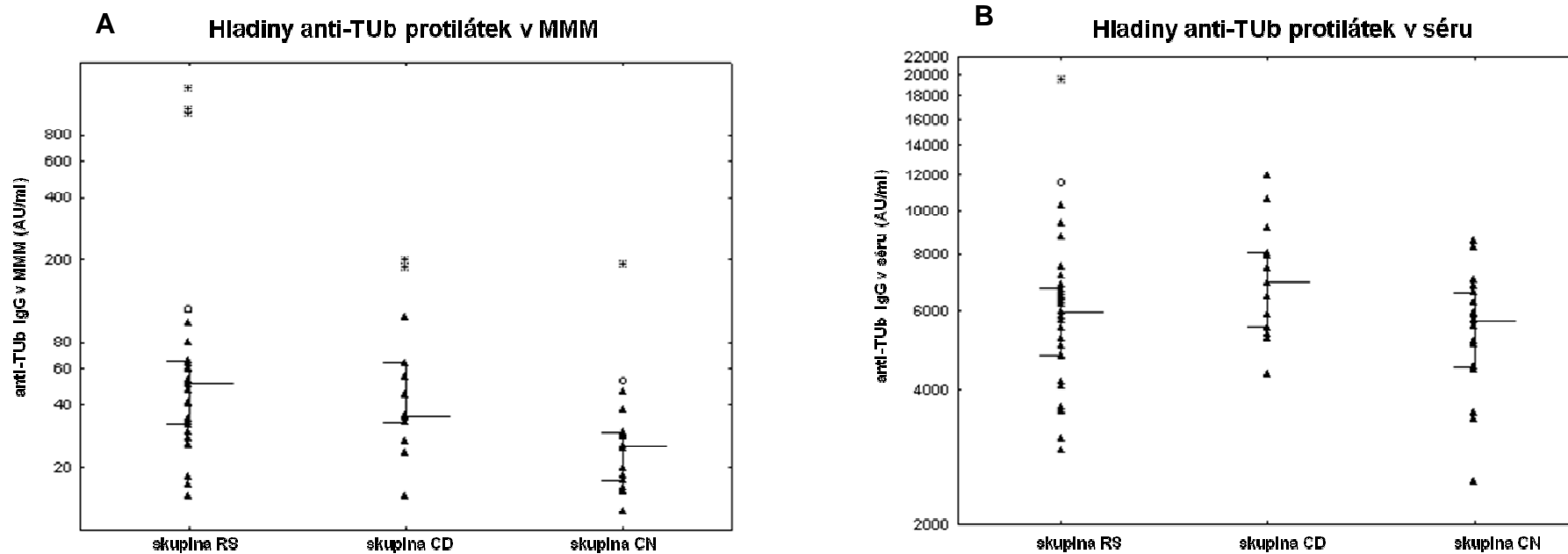
Hladina protilátek proti tubulinu v MMM, kdy byl jako antigen použit hovězí tubulin, odpovídala hladině protilátek proti neuron-specifickému oktapeptidu tubulinu v rámci všech sledovaných skupin pacientů; (RS: $r = 0,8$, $p < 0,0001$; CD: $r = 0,8$, $p < 0,005$; CN: $r = 0,5$; $p < 0,05$). Byla také prokázána slabá korelace mezi oběma typy těchto anti-TU protilátek v séru ve skupině pacientů s RS. U kontrolních skupin žádné tyto korelace pozorovány nebyly; (RS: $r = 0,4$; $p < 0,05$; CD: $r = 0,2$, n.s.; CN: $r = 0,4$, n.s.).

4.1.1.2 Hladiny anti-tubulinových protilátek v séru a mozkomíšním moku

Hladiny anti-tubulinových protilátek byly hodnoceny samostatně pro každý typ použitého antigenu.

V případě ELISA metody, kdy byl jako antigen použit hovězí tubulin, byly zjištěny statisticky významně zvýšené hladiny protilátek v MMM u pacientů s RS ve srovnání s kontrolní skupinou CN ($p < 0,001$). Hladiny těchto anti-tubulinových protilátek (anti-TU_b) byly také zvýšeny v kontrolní skupině CD v porovnání s CN ($p < 0,05$). Hladiny protilátek se však nelišily mezi skupinami RS a CD (obrázek 4-1A). V séru nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi hladinami anti-tubulinových protilátek, v rámci sledovaných skupin (obrázek 4-1B).

Při použití ELISA metody s oktapeptidem tubulinu, jako antigenu navázaného na povrch jamek, byly prokázány statisticky významně vyšší hladiny protilátek (anti-TU_s) v MMM u skupiny RS ve srovnání s CN ($p < 0,005$). Nebyly pozorovány žádné odlišnosti mezi zbývajícími skupinami, v rámci kontrolních skupin CD a CN a skupinou RS pacientů v porovnání s CD. Hladiny sérových anti-tubulinových protilátek se mezi sledovanými skupinami nelišily (obrázek 4-2A, 4-2B).

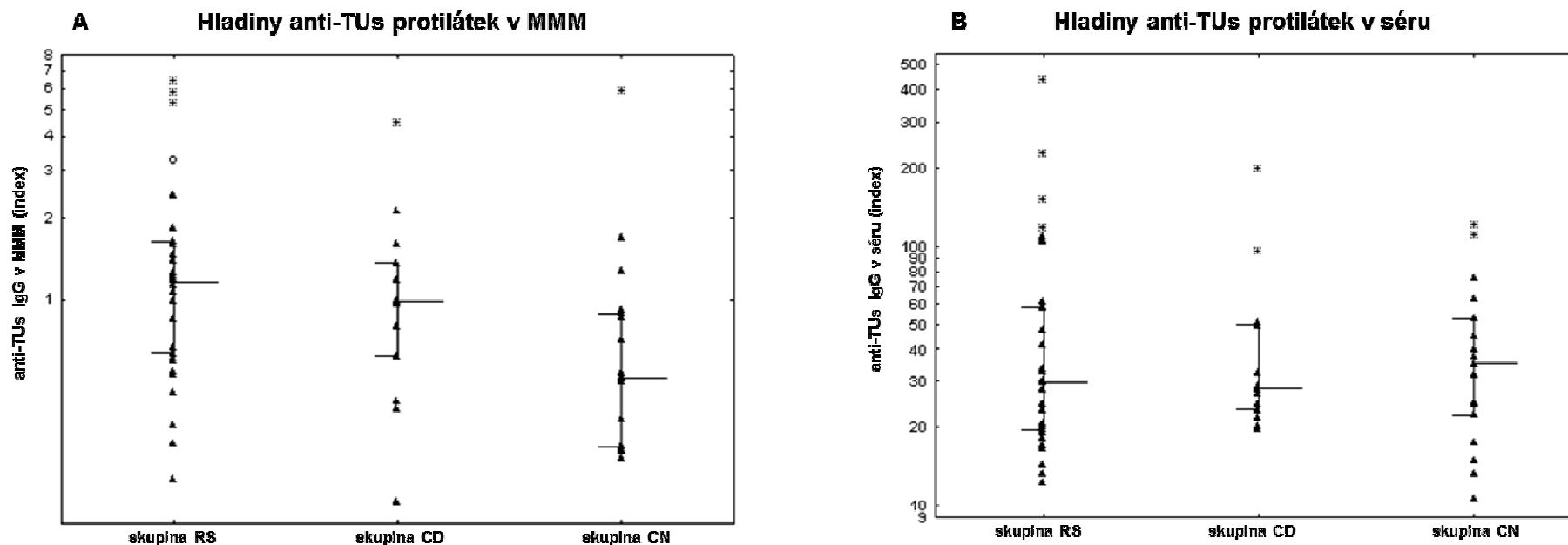


Obrázek 4-1: Hladiny anti-tubulinových (anti-TUB) protilátek v mozkomíšním moku a séru. Jako antigen byl použit tubulin izolovaný z hovězích mozků.

(A) Hladiny anti-TUB protilátek v mozkomíšním moku u pacientů s roztroušenou sklerózou (RS) a ve skupině pacientů s různými neurologickými chorobami (CD) byly zvýšené v porovnání se skupinou normálních kontrolních jedinců (CN). Skupina pacientů RS a CN $p < 0,001$; CD a CN $p < 0,05$. Hladiny anti-TUB protilátek v MMM se nijak nelišily v porovnání skupin RS a CD.

(B) Sérové protilátky byly podobné ve všech skupinách.

Symbol]- značí medián a 25. a 75. percentil. Jednotlivé body představují hodnoty pacientů.



Obrázek 4-2: Hladiny anti-tubulinových (anti-TUs) protilátek v mozkomíšním moku a séru. Jako antigen byl použit syntetický oktapeptid tubulinu specifický pro neuronální buňky.

(A) Hladiny anti-TUs protilátek v mozkomíšním moku u pacientů s roztroušenou sklerózou (RS) byly zvýšené v porovnání se skupinou normálních kontrolních jedinců (CN); $p < 0,005$. Hladiny anti-TUs protilátek v MMM se nijak nelišily v porovnání skupin RS a CD, stejně tak i mezi skupinami CD a CN.

(B) Sérové protilátky byly podobné ve všech skupinách.

Symbol]- značí medián a 25. a 75. percentil. Jednotlivé body představují hodnoty pacientů.

4.1.1.3 Intratekální syntéza anti-tubulinových protilátek

Intratekální syntéza anti-tubulinových protilátek proti neuron-specifickému fragmentu tubulinu, vyjádřená jako index ASI, byla významně zvýšena ve všech skupinách oproti intratekální syntéze anti-tubulinových protilátek proti hovězímu tubulinu. Mezi jednotlivými skupinami nebyly pozorovány žádné statistické významnosti ASI indexu pro oba typy anti-tubulinových protilátek (tabulka 4-2).

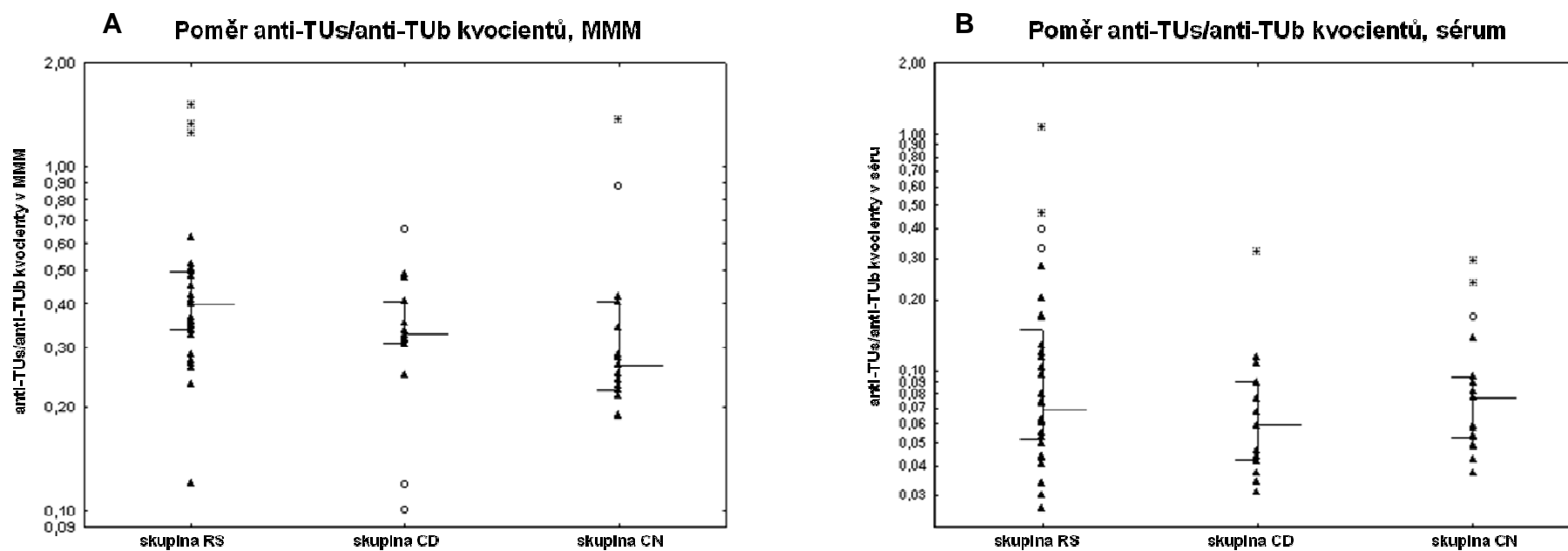
Tabulka 4-2: Specifický index protilátek (ASI) pro anti-TUs a anti-TUb protilátky.

Specifický index protilátek			
	anti-TUb, medián (25.-75. percentil)	anti-TUs, medián (25.-75. percentil)	p
Skupiny pacientů			
RS	1,6 (1,3-2,8)	7,7 (2,5-14,3)	< 0,001
CD	1,8 (1,4-2,7)	6,7 (4,9-13,6)	< 0,005
CN	1,8 (1,6-2,01)	9,4 (5,1-21,7)	< 0,001

RS = roztroušená skleróza; CD = kontrolní skupina, pacienti s různými neurologickými onemocněními; CN = normální kontrolní jedinci; p = hladina významnosti

4.1.1.4 Podíl neuron-specifických protilátek k celkovým protilátkám proti hovězímu tubulinu

Poměr anti-TUs a anti-TUb protilátek byl vyjádřen jako kvocient těchto protilátek jednotlivě pro sérum a mok. Kvocienty byly porovnávány mezi všemi sledovanými skupinami. Nebyl nalezen žádný významnější rozdíl mezi sérovými kvocienty při porovnávání všech skupin. U kvocientů v mozkomíšním moku byl zaznamenán statisticky významný rozdíl při porovnávání mezi skupinami RS a CN ($p < 0,01$), (obrázek 4-3). Obecně, likvorové kvocienty byly ve všech patientských skupinách statisticky významně zvýšené oproti kvocientům v séru; (RS, $p < 0,0001$; CD, $p < 0,005$; CN, $p < 0,001$).



Obrázek 4-3: Anti-TUs/anti-TUub kvocienty vyjadřující poměr neuron-specifických protilátek vzhledem k protilátkové odpovědi proti hovězímu tubulinu. Kvocienty pro mozkomíšní mok byly statisticky významně zvýšené u všech skupin pacientů oproti kvocientům sérovým. (RS, $p < 0,0001$; CD, $p < 0,005$; CN, $p < 0,001$).

(A) Zvýšený likvorový kvocient ve skupině pacientů s RS v porovnání s kontrolní skupinou CN ($p < 0,01$).

(B) Nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami u kvocientů v séru.

Symbol]- představuje medián a 25. a 75. percentil. Jednotlivé body představují hodnoty pacientů.

4.1.1.5 Vztah mezi anti-tubulinovými protilátkami třídy IgG a celkovým IgG v séru a mozkomíšním moku

Korelační analýzy poukázaly na statisticky významné korelace sérových anti-tubulinových protilátek proti hovězímu tubulinu a celkového IgG v séru ve všech sledovaných skupinách. V kontrolní skupině CN hladiny anti-tubulinových protilátek proti hovězímu tubulinu odpovídaly koncentracím IgG v MMM. V případě protilátek proti neuron-specifickému oktapeptidovému fragmentu nebyly nalezeny žádné vztahy mezi protilátkami anti-TUs a celkovým IgG v séru a MMM. U všech tří sledovaných skupin, bez ohledu na použitý antigen, nálezy sérových anti-TU protilátek nekorelovaly s nálezy protilátek v moku. Korelace anti-TUB a anti-TUs protilátek v séru a MMM ukazuje tabulka 4-3.

Tabulka 4-3: Korelace hladin anti-tubulinových protilátek (anti-TUB a anti-TUs) a celkového IgG v séru a mozkomíšním moku.

Skupiny pacientů	korelace	Anti-TUB		Anti-TUs	
		r	p	r	p
RS	S-anti-TU x MMM-anti-TU	0,3	n.s.	0,2	n.s.
	S-anti-TU x S-celkové IgG	0,5	< 0,005	-0,1	n.s.
	MMM-anti-TU x MMM-celkové IgG	0,3	n.s.	0,2	n.s.
CD	S-anti-TU x MMM-anti-TU	0,4	n.s.	-0,03	n.s.
	S-anti-TU x S-celkové IgG	0,7	< 0,01	0,4	n.s.
	MMM-anti-TU x MMM-celkové IgG	0,2	n.s.	-0,03	n.s.
CN	S-anti-TU x MMM-anti-TU	0,3	n.s.	-0,05	n.s.
	S-anti-TU x S-celkové IgG	0,6	< 0,05	0,4	n.s.
	MMM-anti-TU x MMM-celkové IgG	0,6	< 0,05	0,4	n.s.

RS = roztroušená skleróza; CD = kontrolní skupina, pacienti s různými neurologickými onemocněními; CN = normální kontrolní jedinci; S = sérum; MMM = mozkomíšní mok; IgG = imunoglobulin; anti-TU = anti-tubulinové protilátky; anti-TUB = protilátky proti hovězímu tubulinu; anti-TUs = protilátky proti syntetickému neuron-specifickému fragmentu tubulinu; r = Spearmanův korelační koeficient; p = hladina významnosti; n.s. = není signifikantní.

4.1.1.6 Korelace mezi ELISA metodami

Zajímaly mě také korelace mezi koncentracemi anti-TU protilátek stanovovaných oběma metodami ELISA. U všech sledovaných skupin byla zjištěna statisticky významná korelace mezi oběma ELISA metodami pro sledování anti-TU protilátek v MMM. U stanovení sérových protilátek korelace nebyla pozorována (tabulka 4-4).

Tabulka 4-4: Korelace mezi oběma ELISA metodami

Korelace	Sérum		MMM	
	r	p	r	p
Skupiny pacientů				
RS	0,06	n.s.	0,92	p < 0,0001
CD	0,29	n.s.	0,83	p < 0,0001
CN	0,23	n.s.	0,89	p < 0,0001

RS = roztroušená skleróza; CD = kontrolní skupina, pacienti s různými neurologickými onemocněními; CN = normální kontrolní jedinci; MMM = mozkomíšní mok; r = Spearmanův korelační koeficient; p = hladina významnosti; n.s. = není signifikantní.

4.1.1.7 Korelace mezi laboratorními nálezy a demografickými ukazateli

Byl nalezen pouze inverzní vztah mezi intratekální syntézou anti-TU_b protilátek a věkem pacientů ve skupině normálních kontrolních jedinců CN ($r = -0,73$; $p < 0,001$). Žádné jiné korelace s demografickými proměnnými pozorovány nebyly. Intratekální syntéza IgG anti-TU_s a anti-TU_b nezávisí na pohlaví, věku, trvání choroby ani hodnotě EDSS.

4.2 Protilátky proti neurofilamentům u pacientů s ALS

Základní klinické údaje pro skupinu pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou a kontrolní jedince jsou shrnuty v tabulce 4-5.

Tabulka 4-5: Klinické a laboratorní nálezy u pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou

Skupiny pacientů	ALS	ALS BO	ALS KO	Kontroly
Počet pacientů	38	22	16	20
Pohlaví (ženy/muži)	18/20	14/8	4/12	11/9
Věk (roky)*	62 ± 9	65 ± 8	60 ± 9	46 ± 17
Trvání choroby (měsíce)**	9,0 (7,0 – 12,0)	10 (7,0 - 20,0)	8,0 (6,5 - 11,5)	n.a.
ALSFRS skóre	35,0 (33,0 – 37,0)	35,5 (33,0 – 38,0)	34,5 (31,5 – 37,0)	n.a.

*Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± SD

**Hodnoty vyjádřeny jako medián a 25. a 75. percentil

ALS = pacienti s amyotrofickou laterální sklerózou; ALS BO = pacienti s bulbární formou onemocnění ALS; ALS KO = pacienti s končetinovým postižením ALS; ALSFRS = Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale, stupnice sloužící k hodnocení míry invalidity; n.a. = data nejsou známa.

4.2.1 Zhodnocení protilátek

4.2.1.1 Hladiny protilátek proti neurofilamentům

Hladiny anti-NF-L protilátek v séru byly významně zvýšené jak u pacientů s ALS, tak u obou podskupin ALS onemocnění (ALS BO a ALS KO) ve srovnání s kontrolami; (ALS: $p < 0,005$; ALS BO: $p < 0,05$; ALS KO: $p < 0,005$), (obrázek 4-4A). V případě sérových hladin anti-NF-M protilátek byly tyto významně zvýšené pouze u pacientů s bulbární formou onemocnění ALS ve srovnání s kontrolami ($p < 0,05$), (obrázek 4-4B). V mozkomíšním moku byly hladiny anti-NF-L a anti-NF-M protilátek ve skupině pacientů s ALS zvýšeny pouze mírně (obrázek 4-5A, B). Hladiny anti-NF-L protilátek zde korelovaly s hladinami anti-NF-M jak u pacientů s ALS tak ve skupině kontrol, zatímco v séru nebyly pozorovány žádné souvislosti anti-

neurofilamentových protilátek. Jednotlivé korelační vztahy anti-NF protilátek v séru a MMM jsou shrnuty v tabulce 4-6. Z výsledků je patrné, že sice nebyly pozorovány žádné vzájemné vztahy mezi sérovými protilátkami anti-NF (anti-NF-L a anti-NF-M), ale hladiny těchto jednotlivých protilátek si v séru a moku odpovídají.

Tabulka 4-6: Korelace mezi hladinami anti-neurofilamentových protilátek (anti-NF-L a anti-NF-M) třídy IgG v séru a mozkomíšním moku

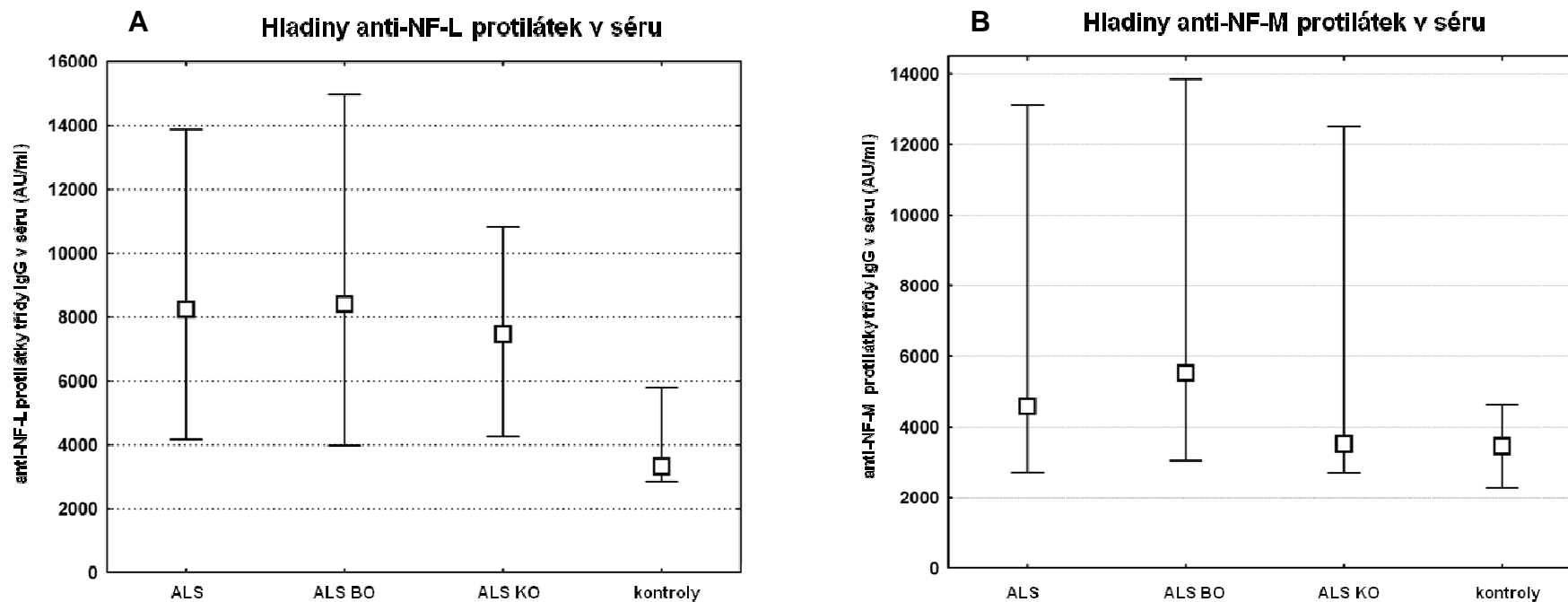
korelace	ALS		Kontroly	
	r	p	r	p
S-anti-NF-L x S-anti-NF-M	0,3	0,058	0,3	n.s.
MMM-anti-NF-L x MMM-anti-NF-M	0,6	< 0,001	0,8	< 0,0001
S-anti-NF-L x MMM-anti-NF-L	0,6	< 0,0001	0,5	< 0,05
S-anti-NF-M x MMM-anti-NF-M	0,5	< 0,001	0,5	< 0,05

ALS = amyotrofická laterální skleróza; anti-NF-L = protilátky proti lehké podjednotce neurofilament; anti-NF-M = protilátky proti střední podjednotce neurofilament; S = sérum; MMM = mozkomíšní mok; r = Spearmanův korelační koeficient; p = hladina významnosti; n.s. = není signifikantní.

4.2.1.2 Intratekální syntéza anti-neurofilamentových protilátek

Intratekální syntéza anti-neurofilamentových protilátek byla posouzena pomocí indexu ASI. Za obvyklou hranici mezi normální a zvýšenou hodnotou odpovídající intratekální syntéze u ALS se považuje hodnota indexu $ASI \geq 1,5$.

Intratekální syntéza anti-NF-L protilátek byla pozorována u osmi pacientů (tři pacienti s bulbární formou ALS a pět pacientů s končetinovým postižením u ALS). Pouze dva pacienti měli mírně zvýšené hodnoty ASI indexu; 1,51 a 1,55. Intratekální syntéza anti-NF-M protilátek byla pozorována u pěti pacientů (jeden pacient s bulbární formou ALS a čtyři pacienti s končetinovou formou onemocnění). Mezi jednotlivými patientskými skupinami nebyly pozorovány žádné statistické významnosti ASI indexů ve srovnání s kontrolní skupinou (obrázek 4-6A, B).

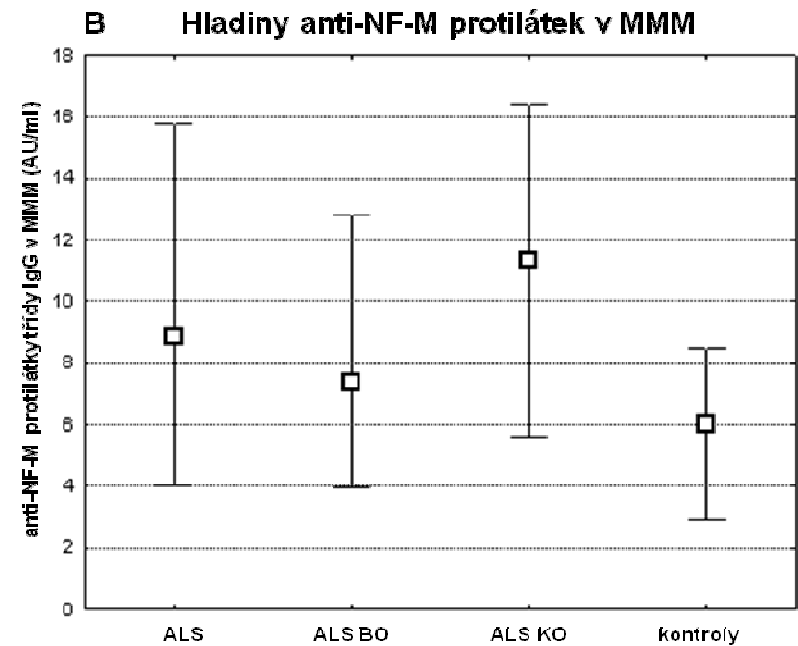
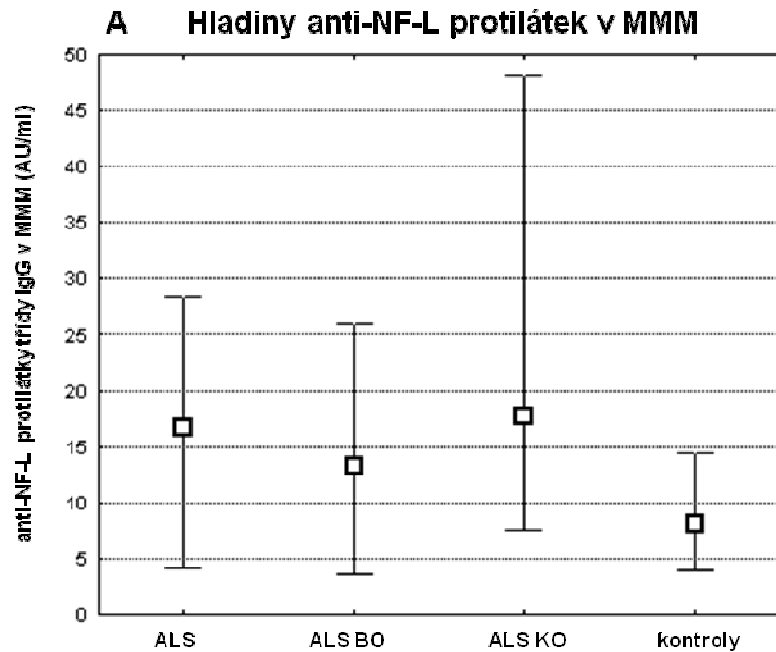


Obrázek 4-4: Hladiny protilátek proti lehké (anti-NF-L) a středně těžké (anti-NF-M) podjednotce neurofilament v séru.

(A) Hladiny anti-NF-L protilátek třídy IgG v séru u pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou (ALS) byly významně zvýšené v porovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,005$). Obdobné, statisticky významně zvýšené hladiny protilátek byly zjištěny u skupin pacientů s bulbární (ALS BO) a končetinovou (ALS KO) formou onemocnění ve srovnání s kontrolami ($p < 0,05$; resp. $p < 0,005$).

(B) Sérové hladiny anti-NF-M protilátek byly statisticky významně zvýšené pouze u skupiny pacientů ALS BO v porovnání s kontrolami ($p < 0,05$)

Symbol \square značí medián, \perp 25% - 75%. AU = arbitrární jednotky.

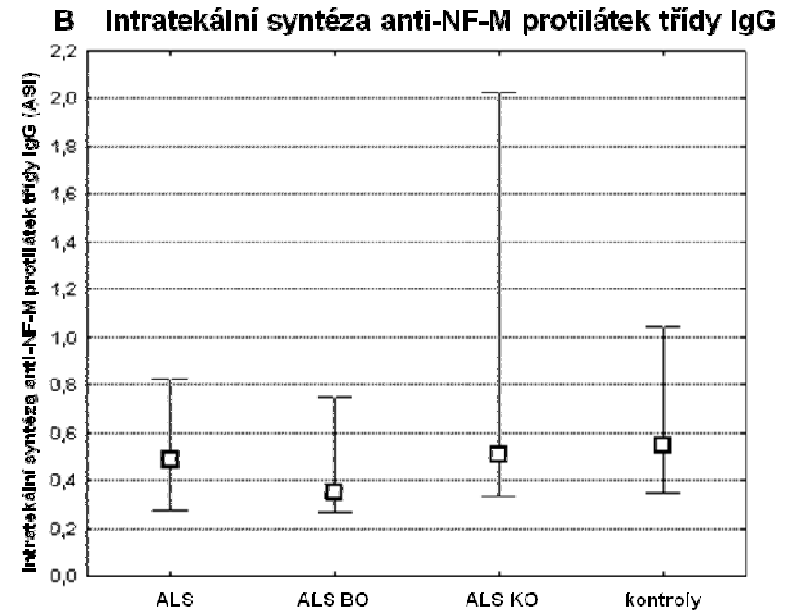
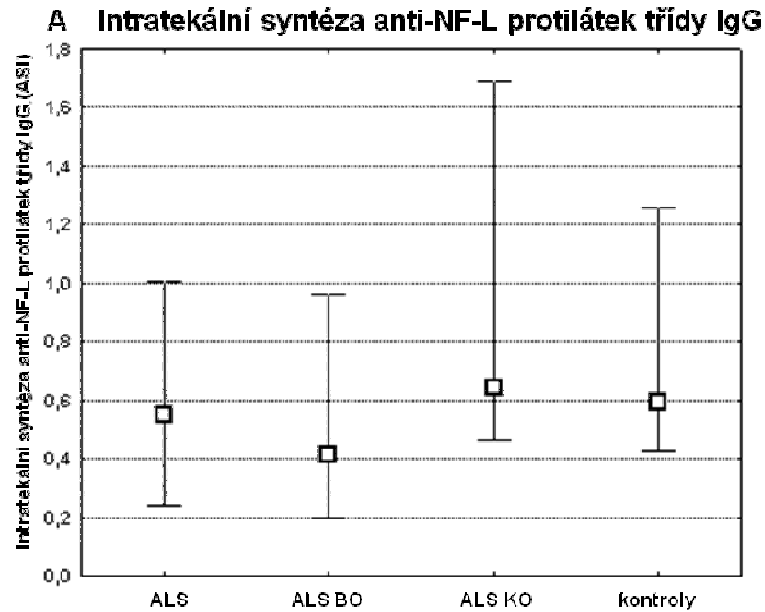


Obrázek 4-5: Hladiny protilátek proti lehké (anti-NF-L) a středně těžké (anti-NF-M) podjednotce neurofilament v mozkomíšním moku.

(A) V MMM u všech skupin pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou (ALS) nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly v hladinách anti-NF-L protilátek, ve srovnání s kontrolami.

(B) Stejně tak nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly v hladinách anti-NF-M protilátek v MMM ve všech pacientských skupinách v porovnání s kontrolami.

Symbol □ značí medián, I 25% - 75%. AU = arbitrární jednotky.



Obrázek 4-6: Intratekální syntéza protilátek třídy IgG proti lehké (NF-L) a středně těžké (NF-M) podjednotce neurofilament.

(A) Intratekální syntéza anti-NF-L IgG protilátek u pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou (ALS), u pacientů s různými formami ALS onemocnění (ALS BO, ALS KO) a ve skupině kontrolních jedinců. Intratekální syntéza byla ve všech skupinách obdobná.

(B) Intratekální syntéza anti-NF-M IgG protilátek u pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou (ALS), u pacientů s různými formami ALS onemocnění (ALS BO, ALS KO) a ve skupině kontrol. Intratekální syntéza byla ve všech skupinách obdobná.

Symbol □ značí medián, I 25% - 75%. ASI = specifický index protilátek; slouží k posouzení intratekální syntézy.

4.2.1.3 Ostatní korelace

Byl potvrzen vztah mezi hladinou anti-neurofilamentových protilátek v mozkomíšním moku a poruchou hematolikvorové bariéry. Funkce bariéry byla hodnocena pomocí albuminového kvocientu Q_{Alb} . Ve skupině pacientů s onemocněním ALS byly statisticky významné vztahy mezi hladinami anti-NF protilátek v MMM a hodnotou Q_{Alb} ; (anti-NF-L: $r = 0,5$; $p < 0,005$; anti-NF-M: $r = 0,4$; $p < 0,05$). Ve skupině kontrolních jedinců nebyly žádné tyto závislosti pozorovány.

Kromě statisticky významných vztahů celkového IgG a sérových anti-NF-L protilátek v kontrolní skupině ($r = 0,5$; $p < 0,05$) nebyly v séru pozorovány žádné statisticky významné korelace mezi celkovým IgG a protilátkami anti-NF-L a anti-NF-M. V MMM byla pozorována statisticky významná korelace mezi celkovým IgG a hladinou anti-NF-L protilátek pouze ve skupině pacientů s ALS ($r = 0,5$; $p < 0,005$).

Věk kontrolních jedinců byl sice významně nižší v porovnání s ALS pacienty ($p < 0,01$), nebyly ale pozorovány žádné souvislosti mezi věkem a hladinami anti-NF protilátek v séru a MMM u pacientů a kontrol. Korelační analýzy nepotvrdily vztah mezi intratekální syntézou anti-NF a věkem v žádné námi sledované skupině pacientů a kontrolních jedinců.

Byly zjištěny významné souvislosti mezi ALSFRS skóre a hladinami anti-NF-L protilátek v séru ve skupině ALS pacientů ($r = -0,3$; $p < 0,05$). Ve skupině ALS pacientů byla také potvrzena souvislost ALSFRS skóre a intratekální syntézy anti-NF-M ($r = -0,4$; $p < 0,05$). Nebyla pozorována žádná korelace mezi dobou trvání onemocnění a hladinami anti-NF protilátek v séru nebo MMM.

5 Diskuze

V rámci této disertační práce jsem pro naše potřeby přizpůsobila již dříve popsané (opublikované) ELISA postupy pro stanovení anti-cytoskeletálních protilátek v séru a mozkomíšním moku (128, 146, 148). Anti-cytoskeletální protilátky jsem studovala u různých onemocnění a na různých souborech pacientů.

5.1 Výsledky – *antitubulinové protilátky*

Ve studii anti-tubulinových protilátek jsem srovnávala dvě ELISA metody lišící se typem antigenu tubulinu, kterým byly potaženy jednotlivé jamky mikrotitrační destičky (stripů). Ke sledování těchto protilátek byly použity antigeny tubulinu – (i) celý tubulin izolovaný z hovězího mozku a (ii) syntetický neuron-specifický oktapeptid tubulinu. Výsledky ukazují, že hladiny protilátek proti tubulinu v mozkomíšním moku, jak proti hovězímu, tak proti syntetickému fragmentu, statisticky významně korelují u všech tří sledovaných skupin. V séru byly pozorovány korelace pouze u skupiny pacientů s RS. Bez ohledu na druh použitého antigenu byly pozorovány obdobné rozdíly hladin anti-TU protilátek mezi jednotlivými skupinami. Tato zjištění jsou překvapující vzhledem k otázce imunitní odpovědi a produkci protilátek na antigenní podnět. Předpokládá se, že ve vazbě protilátek hraje důležitou roli konformace a terciární struktura bílkovin. Celý protein tubulinu nabízí bezpočet antigenních míst, která by mohla vyvolat silnější protilátkovou odpověď, než je u neuron-specifického fragmentu tubulinu o osmi aminokyselinách. Přes všechny tyto předpoklady výsledky této studie ukazují, že je možné pro stanovení anti-tubulinových protilátek v mozkomíšním moku pacientů použít jak celkový hovězí tubulin tak jeho oktapeptid.

Byl také hodnocen klinický význam anti-tubulinových protilátek. Sledováním hladin anti-TU protilátek se zabývalo několik klinických studií u pacientů s traumaty mozku a neurodegenerativními onemocněními (133, 144, 147). Výsledky ukazují zvýšené hladiny anti-TU protilátek u pacientů s roztroušenou sklerózou v porovnání s hladinami těchto protilátek u kontrolních zdravých jedinců. Terryberry a kol. (147) popisují zvýšené hladiny anti-tubulinových protilátek u 67 % pacientů s RS ve srovnání s kontrolami. Pouze 4,5 % kontrolních jedinců mělo zvýšené anti-TU protilátky.

Na zvýšené hladiny anti-TU protilátek u pacientů s RS ukázaly i jiné studie, avšak bez jakékoli statistické významnosti (148).

Cílem této studie bylo porovnat dva druhy ELISA metod v závislosti na použitém typu antigenu. Výsledky ukazují, že při použití ELISA metody s hovězím tubulinem byly zjištěny statisticky významně zvýšené hladiny protilátek v mozkomíšním moku jak u pacientů s RS tak ve skupině kontrolních jedinců s různým neurologickým onemocněním ve srovnání s kontrolní skupinou normálních jedinců. Tato pozorování však spíše obecně odráží axonální poškození doprovázené uvolňováním tubulinu extracelulárně. Naproti tomu statisticky významné rozdíly anti-tubulinových protilátek, u ELISA metody s použitím neuron-specifického oktapeptidu tubulinu, byly pozorovány pouze mezi skupinami RS a CN nikoli mezi skupinami CD a CN. Tyto závěry naznačují pravděpodobnou větší specifitu anti-TUs protilátek u onemocnění RS. Nicméně tyto odhady by musely být potvrzeny jinou rozsáhlejší studií. Je možné, že ta část tubulinu, které je schopna vyvolat syntézu protilátek proti neuron-specifickému fragmentu, může být při axonálním poškození u RS uvolňována mnohem intenzivněji. Některé studie dokonce popisují souvislost mezi hladinami anti-tubulinových protilátek a mírou postižení dle hodnot EDSS (148). Naše výsledky však tato pozorování nepotvrzují. Je sice obtížné tyto závěry vysvětlit, ale rozdíly mohou být také způsobeny počtem a složením skupin pacientů a kontrol.

Při sledování anti-tubulinových protilátek v séru nebyly zjištěny žádné významné korelace. Sérové hladiny anti-TU protilátek byly ve všech sledovaných skupinách obdobné a nebyly pozorovány také žádné souvislosti mezi oběma typy anti-tubulinových protilátek anti-TUs a anti-TUb. Hladiny protilátek proti hovězímu tubulinu v séru odpovídají sérovým hladinám celkového IgG ve všech třech skupinách, ale tento vztah nebyl nalezen v případě anti-tubulinových protilátek proti neuron-specifickému fragmentu tubulinu. V séru pravděpodobně existuje heterogenní skupina anti-TU protilátek, které s antigeny použitými v obou ELISA metodách reagují odlišným způsobem.

Výsledky této studie ukazují, že populace anti-tubulinových protilátek v MMM a séru jsou zřejmě odlišné. Vyhodnocení indexů ASI ukazuje na převládající intratekální syntézu protilátek proti neuron-specifickému oktapeptidu tubulinu. Dále, výsledky získané porovnáním poměrů anti-TUs a anti-TUb kvocientů v MMM a séru ukazují, že protilátky proti neuron-specifickému oktapeptidu tubulinu výrazně převažují

v mozkomíšním moku a to zejména ve skupině RS. Nebyly pozorovány žádné vztahy mezi hladinami anti-tubulinových protilátek v MMM a séru. Ukazuje se tak, že anti-TU protilátky v séru a MMM pravděpodobně nejsou na sobě závislé. Proto není možné, aby stanovení anti-TU protilátek v séru nějakým způsobem nahrazovalo stanovování těchto protilátek v mozkomíšním moku.

V této studii anti-tubulinových protilátek byly potvrzeny významné korelace mezi hladinami anti-TUs a anti-TU_b protilátek v MMM a výsledky také ukazují, že protilátky proti neuron-specifickému oktapeptidu tubulinu jsou syntetizovány převážně intratekálně.

5.2 Výsledky – protilátky proti neurofilamentům u pacientů s ALS

V této studii jsem se snažila posoudit a ověřit výpovědní hodnoty protilátek proti lehké a středně těžké podjednotce neurofilamentového tripletu v séru a MMM u pacientů s ALS v porovnání s kontrolami. A pokusit se tak ukázat, jakou roli v tomto onemocnění hraje imunitní systém v produkci protilátek.

Výsledky ukazují zvýšené sérové hladiny anti-NF-L protilátek u pacientů s ALS a zvýšené hladiny anti-NF-M protilátek v podskupině pacientů ALS BO. V mozkomíšním moku nebyly pozorovány zvýšené hladiny anti-NF ani u jedné ze sledovaných patientských skupin. Tato pozorování mohou vypovídat o možnosti uvolňování neurofilament či jejich fragmentů do krevního oběhu v důsledku degenerace motorických neuronů a tak může být imunitní odpověď proti takovýmto antigenům více prokazatelná v periferní oblasti než v prostoru CNS.

Zabývat se stanovováním intratekální syntézy IgG protilátek proti neurofilamentům pravděpodobně nemá smysl. Při analýzách byly sice u několika málo jedinců pozorovány mírně zvýšené hodnoty indexu ASI pro anti-NF-L či anti-NF-M. Avšak obecně nebyly nalezeny žádné rozdíly v intratekální syntéze anti-NF IgG protilátek při porovnání všech patientských skupin s kontrolami.

To, že nebyl potvrzen žádný vztah mezi hladinami anti-NF-L a anti-NF-M protilátek v séru, může být způsobeno na základě rozdílných antigenních podnětů jednotlivých podjednotek neurofilament v séru a MMM. Tento závěr může být také podporován tím, že nebyly nalezeny významné korelace mezi celkovým IgG a anti-NF-

L (anti-NF-M) v séru pacientů s ALS, na rozdíl od statisticky významných korelací celkového IgG a anti-NF-L protilátek v mozkomíšním moku.

Potvrzené korelace mezi ALSFRS skóre, které ukazuje míru invalidity, a hladinami anti-NF-L protilátek v séru a intratekální syntézou anti-NF-M u pacientů s ALS mohou značit o úloze protilátek v hodnocení stupně postižení.

Není zcela jasné, zda autoprotiilátky hrají roli v patogenezi ALS, nebo jejich přítomnost je epifenomémem imunitní odpovědi. Některé experimenty ukazují, že anti-NF protilátky se na neurodegeneraci při onemocnění ALS podílejí (173, 174). Lidský IgG izolovaný ze séra ALS pacientů může mít cytotoxické účinky nebo způsobit neuronální degeneraci buněk. Tato degenerace je doprovázena zvýšenou hladinou intracelulárního Ca^{2+} a to jak v kultivovaných buňkách tak u myší s onemocněním motoneuronu, kterým byly podávány různé dávky pasivně přenesených ALS IgG (173).

Ve studii protilátek proti neurofilamentům byly zjištěny zvýšené hladiny anti-NF protilátek v séru pacientů s ALS. Hladiny sérových anti-NF-L protilátek nepřímo korelovaly se stupněm postižením pacienta.

6 Shrnutí

V rámci této disertační práce jsem pro naše pokusy optimalizovala již dříve popsané postupy pro stanovení anti-cytoskeletálních protilátek metodou ELISA.

Na souboru pacientů (34 pacientů s RS, 13 pacientů s různým neurologickým onemocněním CD a 17 normálních kontrolních jedinců CN; 38 pacientů s ALS a 20 kontrol) jsem porovnávala hladiny anti-neurofilamentových a anti-tubulinových protilátek současně v séru a mozkomíšním moku.

Ve skupině RS pacientů byly pozorovány zvýšené hladiny anti-TU protilátek ve srovnání s hladinami protilátek u zdravých kontrolních jedinců. Na souboru RS pacientů jsem se také pokusila porovnat dvě různé ELISA metody pro stanovení anti-TU protilátek, které se lišily typem použitého antigenu - hovězí tubulin (anti-TUB protilátky) a syntetický neuron-specifický oktapeptid tubulinu (anti-TUs protilátky).

Výsledky korelační analýzy ukazují statisticky významné korelace anti-TUs a anti-TUB protilátek v rámci všech tří sledovaných skupin v mozkomíšním moku. Korelace v séru byly pozorovány pouze u skupiny pacientů s RS. V případě použití ELISA metody s neuron-specifickým oktapeptidem tubulinu byly zjištěny statisticky významné rozdíly v hladinách anti-tubulinových protilátek pouze mezi skupinami RS a CN. Toto může svědčit o pravděpodobně větší specificitě anti-TUs protilátek u onemocnění RS. Intratekální syntéza anti-TUs protilátek byla signifikantně zvýšena ve všech sledovaných skupinách oproti intratekální syntéze anti-TUB protilátek.

Sledování hladin protilátek proti tubulinu v mozkomíšním moku může přispívat k celkovému hodnocení axonálního poškození. U hodnocení sérových anti-tubulinových protilátek byly závěry zcela odlišné, tudíž takto získané výsledky nejsou pro sledování onemocnění RS užitečné.

U skupiny pacientů s onemocněním ALS byly pozorovány zvýšené sérové hladiny anti-NF-L protilátek u všech ALS pacientů. Protilátky anti-NF-M byly zvýšené pouze v podskupině pacientů ALS BO. V MMM nebylo pozorováno žádné zvýšení ani u jedné ze sledovaných skupin pacientů. Stanovování intratekální syntézy IgG protilátek proti neurofilamentům u ALS pravděpodobně nemá smysl. Výsledky této studie neukázaly rozdíly v intratekální syntéze anti-NF IgG protilátek při porovnání všech patientských skupin s kontrolami.

Skupina pacientů s ALS nebyla sice dostatečně početná, aby bylo možné popsat obecnější závěry o úloze anti-NF protilátek při hodnocení míry postižení, ale výsledky

ukazují, že sérové protilátky proti neurofilamentům mohou hrát roli v autoimunitních mechanismech tohoto onemocnění.

7 Seznam použitých zkratk

ALS	amyotrofická laterální skleróza
ALSFERS	stupnice sloužící k hodnocení míry invalidity (Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale)
AMK	aminokyselina
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-izoxazolpropionová kyselina
anti-NF	protilátky proti neurofilamentům
anti-TU	protilátky proti tubulinu
APP	amyloidový prekurzorový protein
ASI	specifický index protilátek
BAEP	sluchové evokované potenciály
BAD	brachiální amyotrofická diplegie
BCG	mykobakterie kmene bovis
BDNF	mozkový neurotrofický faktor (Brain-derived neurotrophic factor)
BO	bulbární forma amyotrofické laterální sklerózy
BSA	hovězí sérový albumin
CD	pacienti s různými neurologickými chorobami
CDEG	pacienti s neurodegenerativními chorobami
CDMS	klinicky definitivní roztroušená skleróza
CIS	klinicky izolovaný syndrom
CN	skupina normálních kontrolních jedinců
CNF	ciliární neurotrofický faktor
CNS	centrální nervový systém
Dg	diagnóza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EAAT2	transportér excitačních aminokyselin
EAE	experimentální autoimunitní encefalomyelitida
EDSS	Kurtzkeho škála invalidity (Expanded Disability Status Scale)
EEC	El Escorialská kritéria
EMG	elektromyografie
ELISA	enzymoimunochemické stanovení (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

EP	evokované potenciály
FALS	familiární forma amyotrofické laterální sklerózy
GFAP	kyselý gliální fibrilární protein
GTP	guanosintrifosfát
IgG	imunoglobuliny třídy G
KO	končetinová forma amyotrofické laterální sklerózy
MAG	glykoprotein asociovaný s myelinem
MAIFs	inhibiční faktory spojené s myelinem
MAPs	proteiny asociované s mikrotubuly
MBP	myelinový bazický protein
MMM	mozkomíšní mok
MND	motor neuron disease
MOG	myelinový oligodendrocytární glykoprotein
MR	magnetická rezonance
MSA	monomerní muskulární atrofie
MSFC	škála podtestů pro hodnocení RS (Multiple Sclerosis Functional Composite)
MSSS	míra progresu invalidity u pacientů s RS (Multiple Sclerosis Severity Score)
MTOC	mikrotubuly organizující centrum
NAA	N-acetylaspartát
NF	neurofilamenta
NFG	nervový růstový faktor
NF-H	těžká podjednotka neurofilamentového tripletu
NF-L	lehká podjednotka neurofilamentového tripletu
NF-M	středně těžká podjednotka neurofilamentového tripletu
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
PBP	progresivní bulbární paralýza
PLP	proteolipidový protein
PLS	primární laterální skleróza
PP	primárně progresivní forma roztroušené sklerózy
PSA	progresivní svalová atrofie
RP	relabující-progredující forma roztroušené sklerózy

RR	relaps-remitující forma roztroušené sklerózy
RS	roztroušená skleróza
S	sérum
SALS	sporadická forma amyotrofické laterální sklerózy
SD	směrodatná odchylka
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SEP	somatosenzorické evokované potenciály
SOD1	superoxid dismutáza
SP	sekundárně progresivní forma roztroušené sklerózy
TcR	T-buněčný receptor
TU	tubulin
TUb	bovinní tubulin
TUs	syntetický oktapeptid tubulinu
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)
VEP	zrakové evokované potenciály
WFN	Světová neurologická federace (World Federation of Neurology)

8 Seznam citované literatury

1. Havrdová E. Roztroušená skleróza. Triton. 2002.
2. Jarosz Q. en.wikipedia 2009.
3. Havrdová E, a kol. Neuroimunologie. Maxdorf Jessenius. 2004.
4. Batoulis H, Recks MS, Addicks K, Kuerten S. Experimental autoimmune encephalomyelitis - achievements and prospective advances. *APMIS*. 2011;119(12):819-30.
5. Norgren N, Edelstam A, Stigbrand T. Cerebrospinal fluid levels of neurofilament light in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res Bull*. 2005;67(4):264-8.
6. Kornek B, Storch MK, Weissert R, et al. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol*. 2000;157(1):267-76.
7. Zhu B, Luo L, Moore GR, Paty DW, Cynader MS. Dendritic and synaptic pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*. 2003;162(5):1639-50.
8. Qin Y, Duquette P. B-cell immunity in MS. *Int MS J*. 2003;10(4):110-20.
9. Krasulova E, Blahová, J., Šavrdová, E. Roztroušená skleróza - psychoneuroimunologické onemocnění centrálního nervového systému. *Psychiatrie pro praxi*. 2009;10(2):67-71.
10. Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part 2: non-conventional MRI, recovery processes, and management. *Lancet Neurol*. 2005;4(6):341-8.
11. Havrdová E. Roztroušená skleróza. *Ces Slov Neurol*. 2008;71(104):121-32.
12. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:247-69.
13. Horáková D. Roztroušená skleróza a úloha praktického lékaře. *Medicína pro praxi*. 2008;5(10):378-82.
14. Bagert B, Camplair P, Bourdette D. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: natural history, pathophysiology and management. *CNS drugs*. 2002;16(7):445-55.

15. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001;50(1):121-7.
16. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol.* 2005;58(6):840-6.
17. Ziemssen T. Multiple sclerosis beyond EDSS: depression and fatigue. *J Neurol Sci.* 2009;277 Suppl 1:S37-41.
18. Fischer JS, Rudick RA, Cutter GR, Reingold SC. The Multiple Sclerosis Functional Composite Measure (MSFC): an integrated approach to MS clinical outcome assessment. National MS Society Clinical Outcomes Assessment Task Force. *Mult Scler.* 1999;5(4):244-50.
19. Avasarala JR, Cross AH, Trotter JL. Oligoclonal band number as a marker for prognosis in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2001;58(12):2044-5.
20. Correale J, de los Milagros Bassani Molinas M. Oligoclonal bands and antibody responses in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2002;249(4):375-89.
21. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol.* 2006;180(1-2):17-28.
22. Bartoš A, Piřha, J. Roztroušená skleróza. *Causa Subita.* 2008;7(2):41-3.
23. Krasulova E, Havrdova, E. Roztroušená skleróza. *Lékařské listy.* 2008;18:17-21.
24. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology.* 1995;45(7):1277-85.
25. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology.* 1995;45(7):1268-76.
26. Farina C, Weber MS, Meinl E, Wekerle H, Hohlfeld R. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol.* 2005;4(9):567-75.

27. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354(9):899-910.
28. Ziemssen T, Ziemssen F. The role of the humoral immune system in multiple sclerosis (MS) and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Autoimmun Rev.* 2005;4(7):460-7.
29. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1994;57(8):897-902.
30. Bednářová JA, P. Likvorový profil u roztroušené sklerózy mozkomíšní. *Neurologie pro praxi.* 2002;5:249-51.
31. Šťourač P, Bednářová, J. Intratekální, antivirová a oligoklonální IgG syntéza u sclerosis multiplex a její význam v diferenciální diagnostice neurologických onemocnění. *Klin Biochem Metabol.* 2000;8(4):204-8.
32. Ingram G, Hakobyan S, Robertson NP, Morgan BP. Complement in multiple sclerosis: its role in disease and potential as a biomarker. *Clin Exp Immunol.* 2009;155(2):128-39.
33. Villar LM, Masjuan J, Sadaba MC, et al. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Arch Neurol.* 2005;62(4):574-7.
34. Almeras L, Lefranc D, Drobecq H, et al. New antigenic candidates in multiple sclerosis: identification by serological proteome analysis. *Proteomics.* 2004;4(7):2184-94.
35. Reindl M, Linington C, Brehm U, et al. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain.* 1999;122 (11):2047-56.
36. Reindl M, Khantane S, Ehling R, et al. Serum and cerebrospinal fluid antibodies to Nogo-A in patients with multiple sclerosis and acute neurological disorders. *J Neuroimmunol.* 2003;145(1-2):139-47.
37. Berger T, Rubner P, Schautzer F, et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med.* 2003;349(2):139-45.

38. Iglesias A, Bauer J, Litzenburger T, Schubart A, Linington C. T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia*. 2001;36(2):220-34.
39. Al-Chalabi A, Miller CC. Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays*. 2003;25(4):346-55.
40. Teunissen CE, Dijkstra C, Polman C. Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2005;4(1):32-41.
41. Deisenhammer F, Egg R, Giovannoni G, et al. EFNS guidelines on disease-specific CSF investigations. *Eur J Neurol*. 2009;16(6):760-70.
42. Hohlfeld R, Wekerle H. Immunological update on multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2001;14(3):299-304.
43. Krejsek J, Kopecký, O. *Klinická imunologie*. Nucleus HK. 2004.
44. Silber E, Sharief MK. Axonal degeneration in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 1999;170(1):11-8.
45. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998;338(5):278-85.
46. Havrdová E. Roztroušená skleróza: Zánět nebo neurodegenerace? *Neurologia pre prax*. 2007;2:98-101.
47. Wiendl H, Hohlfeld R. Multiple sclerosis therapeutics: unexpected outcomes clouding undisputed successes. *Neurology*. 2009;72(11):1008-15.
48. Daumer M, Neuhaus A, Morrissey S, Hintzen R, Ebers GC. MRI as an outcome in multiple sclerosis clinical trials. *Neurology*. 2009;72(8):705-11.
49. Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 2001;50(3):389-400.
50. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009;132(Pt 5):1175-89.
51. Lassmann H. Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: what have we learnt from animal models. *Exp Neurol*. 2010;225(1):2-8.
52. Derfuss T, Linington C, Hohlfeld R, Meinl E. Axo-glial antigens as targets in multiple sclerosis: implications for axonal and grey matter injury. *J Mol Med* 2010;88(8):753-61.

53. Kasper LH, Shoemaker J. Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology*. 2010;74 Suppl 1:S2-8.
54. Gonsette RE. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci*. 2008;274(1-2):48-53.
55. Riljak V. MD, Jandová K., Langmeier M., Pokorný J. Mechanizmy excitotoxicity. *Čs. fyziologie*. 2009;58(1):23-5.
56. Dujmovic I. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of neuroaxonal damage in multiple sclerosis. *Mult Scler Int*. 2011:1-18.
57. Howell OW, Rundle JL, Garg A, Komada M, Brophy PJ, Reynolds R. Activated microglia mediate axoglial disruption that contributes to axonal injury in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(10):1017-33.
58. Petratos S, Azari MF, Ozturk E, Papadopoulos R, Bernard CC. Novel therapeutic targets for axonal degeneration in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(4):323-34.
59. Huizinga R, Gerritsen W, Heijmans N, Amor S. Axonal loss and gray matter pathology as a direct result of autoimmunity to neurofilaments. *Neurobiol Dis*. 2008;32(3):461-70.
60. Hendriks JJ, Teunissen CE, de Vries HE, Dijkstra CD. Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005;48(2):185-95.
61. Bramlett HM, Kraydieh S, Green EJ, Dietrich WD. Temporal and regional patterns of axonal damage following traumatic brain injury: a beta-amyloid precursor protein immunocytochemical study in rats. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56(10):1132-41.
62. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*. 1997;120 (Pt 3):393-9.
63. Bjartmar C, Kidd G, Mork S, Rudick R, Trapp BD. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2000;48(6):893-901.
64. Casanova B, Martinez-Bisbal MC, Valero C, et al. Evidence of Wallerian degeneration in normal appearing white matter in the early stages of relapsing-remitting multiple sclerosis: a HMRS study. *J Neurol*. 2003;250(1):22-8.

65. De Stefano N, Matthews PM, Fu L, et al. Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain*. 1998;121 (Pt 8):1469-77.
66. Giovannoni G, Green AJ, Thompson EJ. Are there any body fluid markers of brain atrophy in multiple sclerosis? *Mult Scler*. 1998;4(3):138-42.
67. Giovannoni G, Chapman MD, Thompson EJ. The role of antibody affinity for specific antigens in the differential diagnosis of inflammatory nervous system disorders. *J Neuroimmunol*. 2006;180(1-2):29-32.
68. Brettschneider J, Petzold A, Sussmuth SD, Ludolph AC, Tumani H. Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS. *Neurology*. 2006;66(6):852-6.
69. Kunst CB. Complex genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet*. 2004;75(6):933-47.
70. Simpson CL, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis as a complex genetic disease. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(11-12):973-85.
71. Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(11):806-19.
72. Ambler Z. Amyotrofická laterální skleróza. *Neurol. pro praxi*. 2006;1:9-12.
73. Orrell RW. Motor neuron disease: systematic reviews of treatment for ALS and SMA. *Br Med Bull*. 2010;93:145-59.
74. Milonas I. Amyotrophic lateral sclerosis: an introduction. *J Neurol*. 1998;245 Suppl 2:S1-3.
75. Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*. 2006;52(1):39-59.
76. Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4(3):1750-72.
77. Donaghy M. Classification and clinical features of motor neurone diseases and motor neuropathies in adults. *J Neurol*. 1999;246(5):331-3.
78. Strong M, Rosenfeld J. Amyotrophic lateral sclerosis: a review of current concepts. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2003;4(3):136-43.
79. Rocha JA, Reis C, Simoes F, Fonseca J, Mendes Ribeiro J. Diagnostic investigation and multidisciplinary management in motor neuron disease. *J Neurol*. 2005;252(12):1435-47.

80. Keller O. Amyotrofická laterální skleróza, onemocnění motoneuronu. Čes. a slov. Neurol. Neurochir. 2006;69(102):408-17.
81. Carri MT, Ferri A, Cozzolino M, Calabrese L, Rotilio G. Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. Brain Res Bull. 2003;61(4):365-74.
82. Vucic S, Kiernan MC. Pathophysiology of neurodegeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. Curr Mol Med. 2009;9(3):255-72.
83. Robberecht W. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol. 2000;247:2-6.
84. Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. Nat Rev Neurosci. 2006;7(9):710-23.
85. Heath PR, Shaw PJ. Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve. 2002;26(4):438-58.
86. Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. Pharmacol Ther. 1999;81(3):163-221.
87. Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P, et al. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet. 1999;8(2):157-64.
88. de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. Clin Neurophysiol. 2008;119(3):497-503.
89. Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. J Neurol Sci. 1994;124 Suppl:96-107.
90. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2000;1(5):293-9.
91. Belsh JM. ALS diagnostic criteria of El Escorial Revisited: do they meet the needs of clinicians as well as researchers? Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2000;1 Suppl 1:S57-60.

92. Cudkowicz M, Qureshi M, Shefner J. Measures and markers in amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2004;1(2):273-83.
93. materiály firmy Aventis Pharma S.A F. 2010.
94. Alberts Bruce JA, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, and Walter Peter. *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition. 2002.
95. Pollard TD, Earnshaw, W. C. . *Cell Biology*, 2. vydání. Saunders. 2007.
96. Bernot KMCPA. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier Inc. 2004.
97. Petzold A. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci*. 2005;233(1-2):183-98.
98. Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*. 1998;279(5350):514-9.
99. Lariviere RC, Julien JP. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol*. 2004;58(1):131-48.
100. Lodish Harvey AB, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. *Molecular Cell Biology*, 4th edition. New York: W. H. Freeman and company. 2000.
101. Brady ST, Witt AS, Kirkpatrick LL, et al. Formation of compact myelin is required for maturation of the axonal cytoskeleton. *J Neurosci*. 1999;19(17):7278-88.
102. Grant P, Pant HC. Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J Neurocytol*. 2000;29(11-12):843-72.
103. Sihag RK, Nixon RA. Phosphorylation of the amino-terminal head domain of the middle molecular mass 145-kDa subunit of neurofilaments. Evidence for regulation by second messenger-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. 1990;265(7):4166-71.
104. Shea TB. Microtubule motors, phosphorylation and axonal transport of neurofilaments. *J Neurocytol*. 2000;29(11-12):873-87.
105. Lee MK, Cleveland DW. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci*. 1996;19:187-217.
106. McKean PG, Vaughan S, Gull K. The extended tubulin superfamily. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 15):2723-33.
107. Luduena RF. Are tubulin isotypes functionally significant. *Mol Biol Cell*. 1993;4(5):445-57.

108. Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;33(1):95-130.
109. Sullivan KF. Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu Rev Cell Biol.* 1988;4:687-716.
110. Draberova E, Lukas Z, Ivanyi D, Viklicky V, Draber P. Expression of class III beta-tubulin in normal and neoplastic human tissues. *Histochem Cell Biol.* 1998;109(3):231-9.
111. Burgoyne RD, Cambray-Deakin MA, Lewis SA, Sarkar S, Cowan NJ. Differential distribution of beta-tubulin isotypes in cerebellum. *EMBO J.* 1988;7(8):2311-9.
112. Downing KH. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:89-111.
113. Hirokawa N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science.* 1998;279(5350):519-26.
114. Hirokawa N. The mechanisms of fast and slow transport in neurons: identification and characterization of the new kinesin superfamily motors. *Curr Opin Neurobiol.* 1997;7(5):605-14.
115. Hirokawa N, Funakoshi ST, Takeda S. Slow axonal transport: the subunit transport model. *Trends Cell Biol.* 1997;7(10):384-8.
116. Gallant PE. Axonal protein synthesis and transport. *J Neurocytol.* 2000;29(11-12):779-82.
117. Miller CC, Ackerley S, Brownlees J, Grierson AJ, Jacobsen NJ, Thornhill P. Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(2):323-30.
118. Yabe JT, Chan WK, Chylinski TM, Lee S, Pimenta AF, Shea TB. The predominant form in which neurofilament subunits undergo axonal transport varies during axonal initiation, elongation, and maturation. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2001;48(1):61-83.
119. Yabe JT, Pimenta A, Shea TB. Kinesin-mediated transport of neurofilament protein oligomers in growing axons. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 21):3799-814.

120. Roy S, Coffee P, Smith G, Liem RK, Brady ST, Black MM. Neurofilaments are transported rapidly but intermittently in axons: implications for slow axonal transport. *J Neurosci.* 2000;20(18):6849-61.
121. Semra YK, Seidi OA, Sharief MK. Heightened intrathecal release of axonal cytoskeletal proteins in multiple sclerosis is associated with progressive disease and clinical disability. *J Neuroimmunol.* 2002;122(1-2):132-9.
122. Petzold A, Eikelenboom MJ, Keir G, et al. Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76(2):206-11.
123. Gresle MM, Shaw G, Jarrott B, et al. Validation of a novel biomarker for acute axonal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research.* 2008;86(16):3548-55.
124. Lycke JN, Karlsson JE, Andersen O, Rosengren LE. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998;64(3):402-4.
125. Teunissen CE, Iacobaeus E, Khademi M, et al. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology.* 2009;72(15):1322-9.
126. Malmstrom C, Haghighi S, Rosengren L, Andersen O, Lycke J. Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. *Neurology.* 2003;61(12):1720-5.
127. Norgren N, Sundstrom P, Svenningsson A, Rosengren L, Stigbrand T, Gunnarsson M. Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis. *Neurology.* 2004;63(9):1586-90.
128. Eikelenboom MJ, Petzold A, Lazeron RH, et al. Multiple sclerosis: Neurofilament light chain antibodies are correlated to cerebral atrophy. *Neurology.* 2003;60(2):219-23.
129. Salzer J, Svenningsson A, Sundstrom P. Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2010;16(3):287-92.
130. Lim ET, Sellebjerg F, Jensen CV, et al. Acute axonal damage predicts clinical outcome in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2005;11(5):532-6.

131. Petzold A, Brassat D, Mas P, et al. Treatment response in relation to inflammatory and axonal surrogate marker in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2004;10(3):281-3.
132. Brettschneider J, Petzold A, Junker A, Tumani H. Axonal damage markers in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome improve predicting conversion to definite multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2006;12(2):143-8.
133. Škoda D, Hort J, vyhnálek M, Glosová L, Mináriková M, Jinoch P, Kranda K, Bojar M. Specifické protilátky proti beta-tubulinu v diferenciální diagnostice demencí. *Cesk Slov Neurol N.* 2006;70/103(2):152-7.
134. Reijn TS, Abdo WF, Schelhaas HJ, Verbeek MM. CSF neurofilament protein analysis in the differential diagnosis of ALS. *J Neurol.* 2009;256(4):615-9.
135. Norgren N, Rosengren L, Stigbrand T. Elevated neurofilament levels in neurological diseases. *Brain Res.* 2003;987(1):25-31.
136. Siegel George J, ABW, Albers Wayne R, Fisher Stephen K, Uhler Michael D. *Basic Neurochemistry - Molecular, cellular and medical aspects (sixth edition).* Lippincott - Raven. 1999.
137. Markovic M, Trajkovic V, Drulovic J, et al. Antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci.* 2003;211(1-2):67-73.
138. Johns TG, Kerlero de Rosbo N, Menon KK, Abo S, Gonzales MF, Bernard CC. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces a demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis. *J Immunol.* 1995;154(10):5536-41.
139. von Budingen HC, Tanuma N, Villoslada P, Ouallet JC, Hauser SL, Genain CP. Immune responses against the myelin/oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune demyelination. *J Clin Immunol.* 2001;21(3):155-70.
140. Bruck W. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. *J Neurol.* 2005;252 Suppl 5:v3-9.
141. Prat A, Antel J. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2005;18(3):225-30.
142. Bartos A, Fialova L, Soukupova J, Kukul J, Malbohan I, Pitha J. Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand.* 2007;116(2):100-7.

143. Bartos A, Fialova L, Soukupova J, Kukul J, Malbohan I, Pit'ha J. Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2007;254(1):20-5.
144. Skoda D, Kranda K, Bojar M, et al. Antibody formation against beta-tubulin class III in response to brain trauma. *Brain Res Bull*. 2006;68(4):213-6.
145. Kurki P, Helve T, Dahl D, Virtanen I. Neurofilament antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1986;13(1):69-73.
146. Couratier P, Yi FH, Preud'homme JL, et al. Serum autoantibodies to neurofilament proteins in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 1998;154(2):137-45.
147. Terryberry JW, Thor G, Peter JB. Autoantibodies in neurodegenerative diseases: antigen-specific frequencies and intrathecal analysis. *Neurobiol Aging*. 1998;19(3):205-16.
148. Silber E, Semra YK, Gregson NA, Sharief MK. Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit. *Neurology*. 2002;58(9):1372-81.
149. Ehling R, Lutterotti A, Wanschitz J, et al. Increased frequencies of serum antibodies to neurofilament light in patients with primary chronic progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2004;10(6):601-6.
150. Fialova L, Bartos A, Soukupova J, Svarcova J, Ridzon P, Malbohan I. Synergy of serum and cerebrospinal fluid antibodies against axonal cytoskeletal proteins in patients with different neurological diseases. *Folia Biol (Praha)*. 2009;55(1):23-6.
151. Zaffaroni M. Biological indicators of the neurodegenerative phase of multiple sclerosis. *Neurol Sci*. 2003;24 Suppl 5:S279-82.
152. Svarcova J, Fialova L, Bartos A, Steinbachova M, Malbohan I. Cerebrospinal fluid antibodies to tubulin are elevated in the patients with multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2008;15(11):1173-9.
153. Salih AM, Nixon NB, Dawes PT, Matthey DL. Prevalence of antibodies to neurofilament polypeptides in patients with rheumatoid arthritis complicated by peripheral neuropathy. *Clin Exp Rheumatol*. 1998;16(6):689-94.
154. Zetterberg H, Jacobsson J, Rosengren L, Blennow K, Andersen PM. Cerebrospinal fluid neurofilament light levels in amyotrophic lateral sclerosis: impact of SOD1 genotype. *Eur J Neurol*. 2007;14(12):1329-33.

155. Rosengren LE, Karlsson JE, Karlsson JO, Persson LI, Wikkelso C. Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. *J Neurochem.* 1996;67(5):2013-8.
156. Niebroj-Dobosz I, Dziewulska D, Janik P. Auto-antibodies against proteins of spinal cord cells in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Folia Neuropathol.* 2006;44(3):191-6.
157. Yi FH, Lautrette C, Vermot-Desroches C, et al. In vitro induction of neuronal apoptosis by anti-Fas antibody-containing sera from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2000;109(2):211-20.
158. Niebroj-Dobosz I, Janik P, Kwiecinski H. Serum IgM anti-GM1 ganglioside antibodies in lower motor neuron syndromes. *Eur J Neurol.* 2004;11(1):13-6.
159. Smith RG, Hamilton S, Hofmann F, et al. Serum antibodies to L-type calcium channels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 1992;327(24):1721-8.
160. Sengun IS, Appel SH. Serum anti-Fas antibody levels in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003;142(1-2):137-40.
161. Conradi S, Ronnevi LO. Further studies on the occurrence of serum autoantibodies against a membrane bound AChE fraction in ALS/MND patients and controls. *J Neurol Sci.* 1994;124 Suppl:67-9.
162. Niebroj-Dobosz I, Jamrozik Z, Janik P, Hausmanowa-Petrusewicz I, Kwiecinski H. Anti-neural antibodies in serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. *Acta Neurol Scand.* 1999;100(4):238-43.
163. Stevens A, Weller M, Wietholter H. A characteristic ganglioside antibody pattern in the CSF of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1993;56(4):361-4.
164. Bornstein NM, Aronovich B, Korczyn AD, Shavit S, Michaelson DM, Chapman J. Antibodies to brain antigens following stroke. *Neurology.* 2001;56(4):529-30.
165. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology.* 1996;46(4):907-11.
166. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol.* 1983;13(3):227-31.

167. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-52.
168. Group ACTSAPI-IS. The Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale. Assessment of activities of daily living in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch Neurol*. 1996;53:141-7.
169. Cedarbaum JM, Stambler N. Performance of the Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS) in multicenter clinical trials. *J Neurol Sci*. 1997;152 Suppl 1:S1-9.
170. Reiber H, Lange P. Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clinical chemistry*. 1991;37(7):1153-60.
171. Masopust J. *Klinická biochemie, požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. Nakladatelství Karolinum, Univerzita Karlova Praha. 1998.
172. Zima T. *Laboratorní diagnostika*. Galén a nakladatelství Karolinum. 2007;(druhé přepracované vydání).
173. Engelhardt JI, Soos J, Obal I, Vigh L, Siklos L. Subcellular localization of IgG from the sera of ALS patients in the nervous system. *Acta Neurol Scand*. 2005;112(2):126-33.
174. Kimura F, Smith RG, Delbono O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis patient antibodies label Ca²⁺ channel alpha 1 subunit. *Ann Neurol*. 1994;35(2):164-71.
175. Barkhof F, Filippi M, Miller DH, et al. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain*. 1997;120 (Pt 11):2059-69.
176. Tintore M, Rovira A, Martinez MJ, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000;21(4):702-6.

Seznam publikací doktoranda

Publikace týkající se tématu dizertační práce (s IF):

1. Švarcová J, Fialová L, Bartoš A, Šteinbachová M, Malbohan I. Cerebrospinal fluid antibodies to tubulin are elevated in the patients with multiple sclerosis. Eur J Neurol. 2008; 15: 1173-1179. **IF = 2,732**
2. Fialová L, Bartoš A, Soukupová J, Švarcová J, Ridzoň P, Malbohan I. Synergy of serum and cerebrospinal fluid antibodies against axonal cytoskeletal proteins in patients with different neurological diseases. Folia Biologica 2009; 55: 23-26. **IF = 0,924**
3. Fialová L, Švarcová J, Bartoš A, Ridzoň P, Malbohan I, Keller O, Rusina R. Cerebrospinal fluid and serum antibodies against neurofilaments in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Eur J Neurol. 2010; 17: 562-566. **IF = 3,765**

Publikace týkající se jiných témat (s IF):

1. Fialová L, Bartoš A, Švarcová J, Malbohan I. Increased intrathecal high-avidity anti-tau antibodies in patients with multiple sclerosis. PLoS One. 2011; 6(11): e27476. **IF = 4,41**
2. Fialová L, Švarcová J, Bartoš A, Malbohan I. Avidity of antineurocytoskeletal antibodies in cerebrospinal fluid and serum. Folia Microbiol 2012, *in press*. **IF = 0,977**
3. Bartoš A, Fialová L, Švarcová J, Doležil D, Malbohan I. Tau-protein and anti-Tau antibodies in patients with multiple sclerosis. Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie 2012, *in press*. **IF = 0,393**

4. Muravská A, Germanová A, Jáchymová M, Hájek Z, Švarcová J, Zima T, Kalousová M. Association of Pregnancy-associated plasma protein A polymorphism with preeclampsia – A pilot study. Clin Biochem. 2011; 44: 1380-1384.

IF = 2.043

5. Škrha jr. J, Kalousová M, Švarcová J, Muravská A, Kvasnička J, Landová L, Zima T, Škrha J. Relationship of soluble RAGE and RAGE ligands HMGB1 and EN-RAGE to endothelial dysfunction in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. Exp Clin Endocr Diab. 2011, *in press*.

IF = 1.826

6. Volná J, Kemlink D, Kalousová M, Vávrová J, Majerová V, Mestek O, Švarcová J, Šonka K, Zima T. Biochemical oxidative stress-related markers in patients with obstructive sleep apnea. Med Sci Monit. 2011; 17(9): 491-7.

IF = 1,699

7. Koucký M, Germanová A, Kalousová M, Hill M, Cindrová-Davies T, Pařízek A, Švarcová J, Zima T, Hájek Z. Low maternal serum matrix metalloproteinase (MMP)-2 concentrations are associated with preterm labor and fetal inflammatory response. J Perinat Med. 2010; 38(6): 589-96.

IF = 1,871

Publikace týkající se jiných témat (bez IF):

1. Fialová L, Bartoš A, Švarcová J, Doležil D, Malbohan I. Stanovení tau proteinu v mozkomíšním moku pacientů s roztroušenou sklerózou dvěma soupravami ELISA. Klinická biochemie a metabolismus 2011; 19/40(2): 113-118.

Přílohy

Příloha 1: Revidovaná McDonaldova diagnostická kritéria roztroušené sklerózy z r. 2005

Příloha 2: Revidovaná El Escorialská kritéria doporučující využití elektrofyziologických testů pro diagnostiku ALS

Příloha 3: Švarcová J, Fialová L, Bartoš A, Šteinbachová M, Malbohan I. Cerebrospinal fluid antibodies to tubulin are elevated in the patients with multiple sclerosis. Eur J Neurol. 2008; 15: 1173-1179.

Příloha 4: Fialová L, Švarcová J, Bartoš A, Ridzoň P, Malbohan I, Keller O, Rusina R. Cerebrospinal fluid and serum antibodies against neurofilaments in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Eur J Neurol. 2010; 17: 562-566.

Příloha 5: Fialová L, Bartoš A, Soukupová J, Švarcová J, Ridzoň P, Malbohan I. Synergy of serum and cerebrospinal fluid antibodies against axonal cytoskeletal proteins in patients with different neurological diseases. Folia Biologica 2009; 55: 23-26.

Příloha 1:

Revidovaná McDonaldova diagnostická kritéria roztroušené sklerózy z r. 2005 (16)

Klinický obraz		Doplňující údaje potřebné k diagnóze roztroušené sklerózy
Ataky	Objektivní známky léze (lézí)	
2 nebo více	2 nebo více	žádné, klinická symptomatika je dostačující
2 nebo více	1	<ul style="list-style-type: none"> • diseminace v prostoru podle MR mozku nebo • 2 či více lézí na MR mozku kompatibilní s RS a pozitivní MMM nebo • další klinická ataka z jiné lokalizace
1	2 nebo více	<ul style="list-style-type: none"> • diseminace v čase na MR mozku nebo • druhá klinická ataka
1 (mono-symptomatická)	1	<ul style="list-style-type: none"> • diseminace v prostoru podle MR mozku nebo • 2 nebo více lézí na MR mozku kompatibilní s RS a pozitivní MMM a • diseminace v čase podle MR mozku nebo • další klinická ataka z jiné lokalizace
0 (progrese od začátku)	1	<p>progrese nemoci po 1 rok (retrospektivně či prospektivně) a nejméně 2 ze 3 následujících:</p> <ul style="list-style-type: none"> • pozitivní MR mozku (9 nebo více T2 vážených lézí nebo 4 či více T2 vážených lézí s pozitivními VEP) • pozitivní MR míchy (2 nebo více fokálních T2 lézí) • pozitivní MMM
Co znamená pozitivní nález na MRI? [(175, 176)]		
Musí být splněna 3 ze čtyř následujících kritérií:		
<ul style="list-style-type: none"> • 1 Gd-enhancující léze mozku či míchy nebo 9 T2 hyperintenzních mozkových a/nebo míšních lézí v případě, že není žádná Gd-enhancující • 1 nebo více infratentoriálních mozkových nebo míšních lézí • 1 nebo více juxtakortikálních lézí • 3 nebo více periventrikulárních lézí 		
Co znamená diseminace v čase:		
<ul style="list-style-type: none"> • Gd-enhancující léze detekovaná na MRI nejméně 3 měsíce po začátku prvních klinických příznaků, a to v jiné lokalizaci než léze, která způsobila první ataku nebo • nová T2 vážená léze detekovaná MRI (ve srovnání s prvním MRI) nejméně 30 dní po začátku prvních klinických příznaků 		

Co je pozitivní MMM:
• oligoklonální IgG pásy v MMM (nepřítomné v séru) nebo zvýšený IgG index
Co je pozitivní VEP:
• prodloužený, ale dobře zachovaný tvar vlny

Příloha 2: Revidovaná El Escorialská kritéria doporučující využití elektrofyziologických testů pro diagnostiku ALS (88)

1 podmínky pro diagnostiku ALS

• A. Přítomnost

1. degenerace dolního motoneuronu (LMN) – klinická, elektrofyziologická, neuropatologická
2. degenerace horního motoneuronu (UMN) – klinická
3. progresivní rozvoj příznaků v postižené oblasti nebo jejich šíření do dalších oblastí – trvání onemocnění, fyzické a elektrofyziologické testy

• B. Nepřítomnost

1. dalších chorobných procesů, které by mohly vysvětlit degenerace LMN či UMN – elektrofyziologická a patologických nálezů
2. dalších onemocnění, která mohou být vysvětlena na základě zobrazovacích metod – klinická, elektrofyziologická

2 Diagnostika – kategorie

- klinicky jistá ALS – klinicky nebo elektrofyziologicky dokázána přítomnost postižení LMN i UMN v bulbární oblasti a nejméně dvou oblastí současně, nebo postižení LMN a UMN ve třech oblastech.
- klinicky pravděpodobná ALS - známky postižení LMN a UMN ve dvou oblastech
- pravděpodobná, laboratorně podpořená ALS – klinické známky postižení UMN a LMN pouze jedné oblasti a EMG důkaz akutních denervačních změn ve dvou nebo více svalech dvou nebo více končetin
- klinicky možná ALS – známky postižení LMN a UMN společně pouze v jedné oblasti nebo postižení UMN ve dvou či více oblastech nebo známky postižení LMN rostrálně k UMN