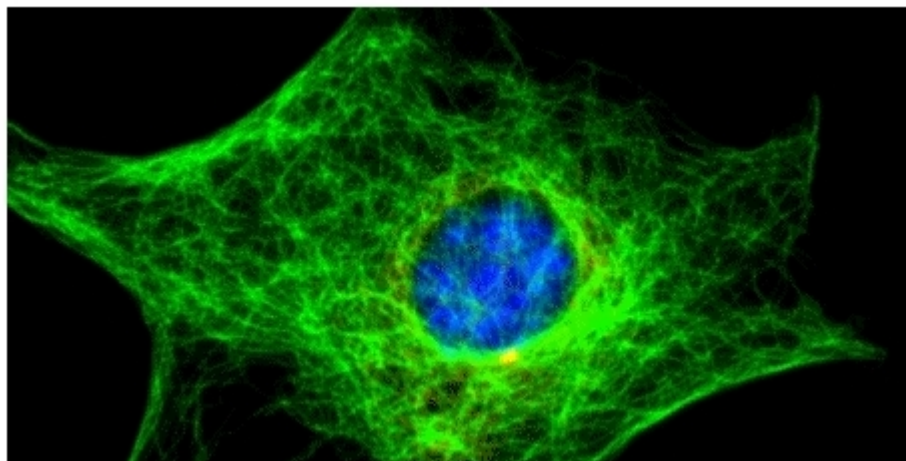


Dizertační práce byla vypracována v kombinované formě doktorského studia v oboru neurověd a vznikla s podporou výzkumného záměru MŠMT Patofyziologie neuropsychiatrických onemocnění a její klinické aplikace č. 0021620816.

Název dizertační práce: Antiaxonální protilátky u roztroušené sklerózy

Doktorand: MUDr. Aleš Bartoš
Univerzita Karlova, 3. LF, Neurologická klinika, FN Královské Vinohrady
tel. 26716 2297, e-mail: abartos@fnkv.cz

Školitel: Prof. MUDr. Pavel Kalvach, CSc., přednosta Neurologické kliniky, UK 3. LF, Praha



Ilustrační foto symbolizující cytoskelet a jádro buňky ve fluorescenčním mikroskopu bylo laskavě zapůjčeno RNDr. Eduardou Dráberovou, CSc., Ústav molekulární genetiky, Akademie věd České republiky

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta



ANTIAXONÁLNÍ PROTILÁTKY

U

ROZTROUŠENÉ SKLERÓZY

MUDr. Aleš BARTOŠ

Doktorská dizertační práce

Praha 2006

Obsah

1	SOUHRN	6
2	ROZTROUŠENÁ SKLERÓZA.....	9
2.1	ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA A ETIOPATOGENEZE.....	9
2.2	KLINICKÝ OBRAZ	10
2.3	PRŮBĚH A PROGNÓZA	13
2.4	DIAGNÓZA.....	14
2.5	LÉČBA	18
3	HUMORÁLNÍ IMUNITA U ROZTROUŠENÉ SKLERÓZY	19
4	K ČEMU JSOU PROTILÁTKY U ROZTROUŠENÉ SKLERÓZY DOBRÉ?.....	23
5	ANTIMYELINOVÉ PROTILÁTKY U ROZTROUŠENÉ SKLERÓZY 25	
6	CYTOSKELET NEURONŮ	27
7	AXONÁLNÍ POSTIŽENÍ U ROZTROUŠENÉ SKLERÓZY	33
8	NEUROFILAMENTA A PROTILÁTKY PROTI NEUROFILAMENTŮM.....	38
8.1	NEUROFILAMENTA	40
8.2	NEUROFILAMENTA U ROZTROUŠENÉ SKLERÓZY	42
8.3	NEUROFILAMENTA U OSTATNÍCH NEUROLOGICKÝCH ONEMOCNĚNÍ....	43
8.4	PROTILÁTKY PROTI NEUROFILAMENTŮM U RS	43
8.5	PROTILÁTKY PROTI NEUROFILAMENTŮM U OSTATNÍCH ONEMOCNĚNÍ....	44
9	VÝCHODISKA VÝZKUMNÉ PRÁCE.....	45
10	HYPOTÉZY A MOTIVY VÝZKUMU.....	47
11	PACIENTI A METODIKA.....	49
11.1	PACIENTI A KONTROLNÍ OSOBY	49
11.2	STANOVENÍ ZÁKLADNÍCH PROTEINŮ A VÝPOČTY	51
11.3	STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI NEUROFILAMENTŮM	52
11.4	STATISTIKA	53
12	VÝSLEDKY	54
12.1	PROTILÁTKY PROTI LEHKÉ PODJEDNOTCE NEUROFILAMENTOVÉHO TRIPLETU	54
12.2	PROTILÁTKY PROTI STŘEDNĚ TĚŽKÉ PODJEDNOTCE NEUROFILAMENTOVÉHO TRIPLETU	64
13	DISKUZE.....	75
14	LITERATURA.....	85
15	SUMMARY	102
16	PODĚKOVÁNÍ.....	104
17	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	107
18	SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA.....	109
19	SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA VZTAHUJÍCÍCH SE K TÉMATU 117	

1 Souhrn

Úvod. V posledních letech došlo s novými poznatky k přehodnocení některých názorů na roztroušenou sklerózu (RS). Původně se tradovalo, že se jedná o autoimunitní demyelinizační onemocnění postihující roztroušeně bílou hmotu centrálního nervového systému. Dnes se choroba považuje za difúzní, vytrvale probíhající autoimunitní a neurodegenerativní proces bílé i šedé hmoty CNS zahrnující demyelinizační i axonální poškození již od časných stadií.

Axonální poškození u roztroušené sklerózy se prokázalo histopatologickými nálezy a na magnetické rezonanci mozku a míchy. Může být zodpovědné za trvalý nebo narůstající neurologický deficit a být cílem neuroprotektivní léčby. Proto má význam hledat ukazatele tohoto pochodu také v mozkomíšním moku nebo séru.

U roztroušené sklerózy se mohou při axonálním poškození uvolňovat některé cytoskeletální bílkoviny neuronu. Protilátky proti těmto proteinům se mohou podílet na poškozování axonu nebo vznikají jako humorální reakce na nově přítomné cytoskeletální antigeny. Protilátková odpověď proti jednomu druhu těchto proteinů – neurofilamentům – může nepřímo signalizovat míru axonální patologie u RS.

Cíl. Na velkém souboru pacientů zhodnotit hladinu anti-neurofilamentových protilátek v moku a séru u různých forem RS a porovnat je s kontrolními skupinami pacientů a rovněž posoudit závislost protilátkové odpovědi na průběhu, trvání, invalidizaci a progresi RS.

Pacienti a metodika. Protilátky proti *lehké podjednotce* (NFM) neurofilamentového tripletu v obou imunoglobulinových třídách IgG a IgM byly stanoveny ELISA metodou v párových vzorcích séra a mozkomíšního moku u 58 pacientů s RS, 24 normálních kontrol (CN), 49 kontrol s různými chorobami (CD) a u 31 pacientů s neurodegenerativními nemocemi (CDEG). Totéž bylo

provedeno ke stanovení protilátek proti *středně těžké podjednotce* (NFM) u 49 pacientů s RS, 16 normálních kontrol (CN), 21 kontrol s různými chorobami (CD) a u 14 pacientů s neurodegenerativními nemocemi (CDEG).

Výsledky. Intratekální syntéza protilátek IgG proti *NFL* byla zvýšená u pacientů s RS proti skupině CD ($p = 0.002$), ale nikoli CN vzhledem k vysokým hladinám u některých jedinců ve skupině CN. Žádný rozdíl v intratekální produkci anti-NFM IgM nebyl nalezen mezi pacienty s RS a kontrolami. Intratekální syntéza IgM proti NFL byla vyšší u skupiny CDEG než u CN, CD a dokonce RS skupiny ($p < 0.01$). Anti-NFL IgG protilátky v séru korelovaly s hladinou mozkomíšních protilátek ve skupině RS ($r = 0.5$, $p = 10^{-5}$) a CN ($r = 0.5$, $p = 0.02$). Opakované měření prokázalo stabilní anti-NFL produkci.

Intratekální produkce protilátek IgM a IgG proti *NFM* byla zvýšená u pacientů s roztroušenou sklerózou ve srovnání se skupinou CN nebo CD ($p < 0.04$ pro IgM, $p < 0.01$ pro IgG). Pacienti s různými druhy průběhů (relaps-remitující, sekundárně nebo primárně progredující forma) měli podobně zvýšenou syntézu antineurofilamentových protilátek. Pacienti s RS vykazovali obdobnou vyšší lokální syntézu IgG a IgM v CNS jako pacienti CDEG. Intratekální syntéza nekorelovala s věkem, trváním choroby, invalidizací ani rychlostí progresu choroby. U pacientů s RS a u CN nebyla žádná vazba mezi hladinou protilátek v séru a moku, a to pro antineurofilamentové protilátky IgM i IgG. Sérové i mozkomíšní hladiny antineurofilamentových protilátek se nelišily mezi pacienty s RS a kontrolami. Z těchto pozorování vyplývá, že není možné používat pouze vyšetření ze séra, a tak nahradit vyšetření mozkomíšního moku spojené s invazivní procedurou. Proto je zapotřebí ke zhodnocení protilátkového stavu pacientů používat intratekální syntézu zohledňující vztah mezi sérem a mozkomíšním mokem.

Závěr. Intratekální syntéza anti-*NFL* protilátek může být zvýšená u podskupiny pacientů s RS. Protilátková odpověď IgG proti NFL v mozkomíšním moku může být předpovídána ze séra. Stanovení protilátek IgM proti NFL u RS nemá smyslu, ale může být užitečné u neurodegenerativních onemocnění. Intratekální syntéza protilátek IgM a IgG proti *NFM* je u pacientů s RS zvýšená. Mezi mírou protilátkové odpovědi proti NFL či NFM a klinickými parametry včetně míry progresu onemocnění nebyla nalezena hlubší asociace.

2 Roztroušená skleróza

(Havrdová a kol. 2001; Štourač 2002; Havrdová a Nováková 2004; Kolar a kol. 2004; Bartoš a Piřha 2004; Piřha 2005)

2.1 Základní charakteristika a etiopatogeneze

Roztroušená skleróza (RS) je zánětlivé onemocnění centrálního nervového systému s účastí autoimunitních mechanismů. Postihuje nejčastěji mladé jedince mezi 20 – 40 lety, výjimečně před 18. rokem a po 50. roce. Vyšší výskyt onemocnění je u žen v poměru přibližně 2-3:1. V ohraničených zánětlivých ložiskách v mozku a míše o velikosti většinou 0,5-1 cm (tzv. **plakách**) dochází nejen ke ztrátě myelinové pochvy nervového vlákna (**demyelinizace**), ale již v časných stádiích choroby k **přerušeni kontinuity samotného axonu**. Zatímco za příhodných okolností může “nahý” axon částečně znovu myelinizovat (**remyelinizace**), přerušeni axonu znamená nevratný zánik vedení, a tudíž i funkce. Osud většiny zánětlivých lézí končí hojením gliovou jizvou (astroglióza). Hutnější konzistence akumulovaných astrocytů oproti sousední mozkové tkáni při prvních pitvách mozku pacientů se nazvala **sklerózou** (skleros=tvrdý). A protože tato ložiska byla rozeseta v různých oblastech mozku, získala choroba přídomek “**roztroušená**”. Nová imunohistochemická pozorování doplněná poznatky z magnetické rezonance (MR) mozku vnesly zcela nový pohled na patogenezu onemocnění. Tradovaný a stále platný vývoj od primární demyelinizace k sekundární axonální ztrátě byl obohacen o zjištění, že axonální postižení nastává již v časných stádiích, tj. bez předchozí dlouhodobější demyelinizace. Přibylo důkazů, že není zachváčena jen ta část mozkové tkáně v oblasti plak, ale i okolní zdánlivě normálně vyhlížející **bílá hmota** a překvapivě i **šedá hmota** (mozková kůra, talamus). Znamená to, že původní představa o roztroušenosti pouhého zánětu po bílé hmotě mozkové a míšní musí

být opuštěna. Na onemocnění je nutné nazírat jako na **difúzní** proces v celém centrálním nervovém systému (CNS).

2.2 Klinický obraz

Vzplanutí zánětu nebo axonální poškození v klinicky strategickém okrsku se projeví dysfunkcí podle postižené nervové dráhy. Rozmanitost příznaků tedy odpovídá různým lokalitám mozku, míchy a zrakových nervů.

Jedním z nejnápadnějších projevů bývá zánět zrakového nervu tzv. **optická neuritida**, která může být lokalizována za okem (tzv. retrobulbární) nebo v oblasti papily (tzv. intraokulární). Jedná se o postupný výpadek zorného pole, někdy až do úplné slepoty, provázený občas bolestí za bulbem při jeho pohybu. Teprve po delším čase nebo opakovaných příhodách se může vyvinout zpočátku charakteristické temporální nablednutí, později atrofie papily zrakového nervu.

Porucha hybnosti může zahrnovat jednu až všechny čtyři končetiny v různých kombinacích (tzv. mono-, para-, hemi-, tri-, kvadru- paréza). Těživým problémem bývá pro pacienta zejména neobratnost rukou, obtíže při jemných ručních činnostech, jako např. psaní, zapínání knoflíků, používání příborů. Hybnost lze také posuzovat podle dosahu chůze do zastavení.

Závratě (vertigo) nebo nejistota až “opilecké” **vrávorání** při stožení a chůzi (trupová ataxie) signalizuje dysfunkci mozkového kmene nebo mozečku. Pro pacienta je jedním z nejvíce obtěžujících příznaků lze jej kompenzovat minimálně. Jiným projevem mozečkového postižení je **nepřesné cílení** nebo **třes** ruky při snaze něco uchopit. Často bývá kombinováno se slabostí ruky.

Na potíže s vyměšováním **moče a stolice** či **sexuální dysfunkci** je třeba se ptát cíleně, neboť pacienti se za tento deficit stydí. Existuje totiž celá řada léčebných opatření, jak pacientovi usnadnit život, ať už farmakologických, chirurgických nebo možnost autokatetrizace.

Nejméně závažným a často přehlíženým příznakem bývá brnění či mravenčení (**parestezie**) nebo naopak **necitlivost** často bizarní lokalizace – jedna končetina nebo její část, obručovitě stahování hrudníku nebo břicha (charakteristické pro míšní plaku).

Při pokročilejším onemocnění se objevují i kognitivní poruchy, nejčastěji ve formě subkortikálních deficitů a mnestických poruch.

Míra invalidity se posuzuje v klinické praxi nejčastěji pomocí tzv. Kurtzkeho škály Expanded Disability Status Scale (**EDSS**). Stupeň postižení se vyjadřuje číslem a invalidita narůstá po půl bodu od nulové hodnoty při normálním neurologickém nálezů až k číslu 10, které představuje smrt po předchozí úrovni totálně nesoběstačného, ležícího pacienta (tab. 2.1). Výsledná hodnota je kombinací dosahu chůze a zhodnocení jednotlivých funkčních systémů: motorických, mozečkových, kmenových, senzitivních, vylučovacích, zrakových a mentálních funkcí.

Tab. 2.1 Kurtzkeho škála invalidity roztroušené sklerózy tzv.
Expanded Disability Status Scale (EDSS)

EDSS							
A. NEUROLOGICKÝ NÁLEZ PACIENTA							
stupeň postižení funkčního systému	0	1	2	3	4	5	6
motorický							
mozečkový							
kmenová symptomatika							
senzitivní							
vylučovací							
zrakový							
mentální							
jiná symptomatika							
B. MOBILITA							
chůze bez pomoci a odpočinku s dosahem v metrech	bez omezení						do 3.5
	500						4.0
	300						4.5
	200						5.0
	100						5.5
dopomoc (hůl, berle či jiná opora)	jednostranná / 100 s i bez odpočinku						6.0
	konstantní oboustranná / 20 bez odpočinku						6.5
	s pomocí druhé osoby / 5						7.0
invalidní vozík	téměř odkázán	přesuny bez cizí pomoci		s pomocí druhé osoby 5 m		7.0	
	zcela odkázán, úplná závislost	přesuny s cizí pomoci		jen několik málo kroků		7.5	
lůžko	mimo lůžko po většinu dne, soběstačný v mnoha úkonech, funkční HKK, samoobslužnost zachována						8.0
	převážně upoután, částečně funkční HKK, některé bazální sebeobslužné úkony zachovány						8.5
	zcela upoután, nesoběstačný						9.0
	totálně nesoběstačný, neschopen komunikace či příjmu stravy						9.5
C. SOBĚSTAČNOST							
nezávislost na pomoci druhé osoby						do 4.0	
soběstačný, ač plná aktivita má své omezení a/nebo vyžaduje asistenci						4.5	
nemožnost zvládnout plnou denní zátěž bez speciálních pomůcek a opatření,						5.0	
vylučuje se plná denní aktivita						5.5	
Celkové skóre							

Kumulativní tíži postižení lze hodnotit pomocí tzv. Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS), který je kombinovaným vyjádřením míry invalidizace a trvání choroby (tab. 2.2) (Roxburgh a kol. 2005). MSSS bylo vyvinuto ke kompenzaci nelinearity EDSS a za účelem určení rychlosti progresu u pacientů s RS, když určitý pacient má jediné vyšetření.

Tab. 2.2 Kumulativní tíže postižení roztroušené sklerózy pomocí tzv. Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) (převzato z Roxburgh a kol. 2005).

	0	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	EDSS
1	0.67	2.44	4.30	5.87	7.08	7.93	8.64	9.09	9.35	9.50	9.63	9.74	9.84	9.90	9.94	9.97	9.98	9.98	9.99	
2	0.53	2.01	3.69	5.24	6.46	7.27	7.98	8.58	8.95	9.18	9.38	9.59	9.79	9.88	9.93	9.97	9.99	9.99	9.99	
3	0.45	1.77	3.34	4.82	6.00	6.81	7.54	8.14	8.55	8.83	9.07	9.35	9.63	9.77	9.86	9.92	9.97	9.98	9.99	
4	0.35	1.45	2.87	4.27	5.41	6.24	6.98	7.65	8.12	8.42	8.70	9.08	9.47	9.68	9.80	9.88	9.95	9.98	9.99	
5	0.30	1.28	2.60	3.90	4.95	5.79	6.58	7.26	7.75	8.08	8.38	8.83	9.32	9.60	9.76	9.86	9.95	9.98	9.99	
6	0.25	1.13	2.33	3.54	4.55	5.38	6.14	6.81	7.33	7.68	7.98	8.50	9.08	9.45	9.68	9.81	9.93	9.97	9.99	
7	0.24	1.04	2.10	3.17	4.13	4.96	5.75	6.46	6.98	7.32	7.65	8.24	8.91	9.33	9.59	9.76	9.90	9.95	9.99	
8	0.21	0.94	1.92	2.93	3.81	4.57	5.36	6.10	6.61	6.95	7.32	7.97	8.71	9.21	9.55	9.74	9.89	9.96	9.99	
9	0.21	0.88	1.76	2.65	3.45	4.17	4.93	5.64	6.14	6.50	6.90	7.65	8.33	9.09	9.47	9.70	9.87	9.95	9.99	
10	0.19	0.78	1.53	2.34	3.10	3.79	4.55	5.28	5.77	6.14	6.58	7.39	8.31	8.92	9.34	9.61	9.83	9.94	9.99	
11	0.17	0.74	1.40	2.13	2.82	3.46	4.21	4.94	5.42	5.82	6.30	7.18	8.15	8.79	9.24	9.52	9.78	9.92	9.98	
12	0.16	0.64	1.28	1.98	2.64	3.25	3.94	4.63	5.13	5.54	6.03	6.92	7.93	8.63	9.13	9.43	9.71	9.88	9.97	
13	0.13	0.57	1.14	1.80	2.44	3.05	3.70	4.38	4.91	5.32	5.80	6.74	7.83	8.55	9.03	9.34	9.65	9.85	9.96	
14	0.11	0.49	1.03	1.70	2.33	2.91	3.55	4.26	4.82	5.23	5.70	6.66	7.79	8.34	8.86	9.20	9.57	9.82	9.95	
15	0.10	0.45	0.99	1.64	2.26	2.82	3.44	4.14	4.68	5.09	5.51	6.33	7.41	8.17	8.70	9.11	9.51	9.78	9.94	
16	0.09	0.38	0.85	1.42	1.99	2.56	3.17	3.86	4.41	4.81	5.18	6.00	7.14	7.97	8.54	9.04	9.49	9.75	9.94	
17	0.05	0.32	0.76	1.28	1.77	2.30	2.95	3.65	4.17	4.55	4.94	5.74	6.89	7.77	8.38	8.99	9.52	9.79	9.96	
18	0.04	0.26	0.66	1.12	1.57	2.09	2.70	3.37	3.89	4.27	4.62	5.43	6.62	7.54	8.23	8.94	9.51	9.78	9.96	
19	0.05	0.28	0.63	1.00	1.39	1.89	2.50	3.19	3.72	4.12	4.49	5.35	6.59	7.51	8.22	8.96	9.57	9.81	9.98	
20	0.05	0.26	0.59	0.94	1.29	1.71	2.29	2.99	3.51	3.93	4.30	5.15	6.43	7.45	8.23	8.98	9.58	9.80	9.95	
21	0.05	0.30	0.66	1.02	1.39	1.77	2.34	2.97	3.43	3.83	4.21	5.09	6.35	7.33	8.08	8.87	9.49	9.77	9.96	
22	0.04	0.23	0.54	0.90	1.28	1.66	2.20	2.82	3.29	3.69	4.09	5.04	6.35	7.35	8.10	8.84	9.42	9.73	9.95	
23	0.05	0.27	0.58	0.91	1.26	1.64	2.19	2.78	3.21	3.69	4.19	5.16	6.47	7.46	8.20	8.87	9.43	9.75	9.95	
24	0.05	0.24	0.52	0.86	1.25	1.63	2.15	2.71	3.09	3.52	4.01	5.03	6.36	7.38	8.15	8.81	9.39	9.74	9.96	
25	0.05	0.23	0.47	0.77	1.15	1.56	2.05	2.53	2.84	3.21	3.74	4.88	6.26	7.24	8.00	8.73	9.35	9.75	9.98	
26	0.05	0.20	0.45	0.78	1.17	1.58	2.08	2.63	2.99	3.40	3.95	5.02	6.39	7.44	8.21	8.89	9.48	9.80	9.96	
27	0.05	0.22	0.48	0.78	1.15	1.56	2.03	2.56	2.91	3.29	3.86	4.93	6.33	7.38	8.14	8.91	9.56	9.85	9.98	
28	0.04	0.17	0.40	0.74	1.16	1.52	1.88	2.39	2.76	3.04	3.46	4.54	5.99	7.07	7.90	8.75	9.45	9.80	9.98	
29	0.03	0.18	0.47	0.80	1.19	1.51	1.79	2.27	2.68	3.01	3.41	4.35	5.68	6.76	7.66	8.62	9.38	9.75	9.96	
30	0.01	0.13	0.45	0.82	1.19	1.45	1.69	2.23	2.75	3.13	3.50	4.35	5.61	6.66	7.54	8.47	9.27	9.67	9.91	

2.3 Průběh a prognóza

Vzplanutí choroby s klinickou progresí příznaků v průběhu dnů až týdnů se označuje jako **ataka**, případně **exacerbace**. Vyžaduje se alespoň 24hodinové trvání klinických příznaků, které pozvolna regredují v průběhu dnů až týdnů, a to buď zcela nebo s reziduálním deficitem. Nově se ujal nový termín tzv. klinicky izolovaný syndrom (CIS). Označuje se tím jediná neurologická příhoda odpovídající lézi v CNS (nejčastěji retrobulbární neuritida, kmenové syndromy, míšní syndromy), která s ohledem na

víceložiskové postižení na magnetické rezonanci (MR) mozku nebo míchy splňuje již kritéria pro časnou diagnózu RS (McDonald a kol. 2001). U většiny pacientů (60-80 %) se při dalších atakách buď prohlubují dřívější deficity nebo se objevují nové potíže. Období bez klinických projevů mezi exacerbacemi (**remise**) jsou nevyzpytatelně různě dlouhá – od jednoho měsíce až po několik let. Po této tzv. **relaps–remitující** fázi následuje plynulé narůstání neurologické invalidizace bez jasně ohraničených atak (tzv. **sekundární progresse**). **Primárně progresivní formou** roztroušené sklerózy se označuje postupné prohlubování neurologické symptomatiky od samotného začátku bez předchozího relaps-remitujícího stadia. Ve fázi relapsů se předpokládá intenzivní složka zánětlivá s relativně příznivou odezvou na léčbu, zatímco u progresivních forem převládá málo léčitelná složka degenerativní s vyčerpáním kompenzačních schopností. Dělení subtypů podle klinické manifestace je ovšem poněkud umělé. Z četných studií s použitím MR mozku vyplynulo, že aktivita choroby je trvalá i v obdobích tzv. klinické remise! Charakter roztroušenosti si choroba podržuje střídáním ataky s relapsem, i když podle MR se jedná u většiny pacientů o **vytrvale progresivní** onemocnění mozku a míchy od samotného začátku.

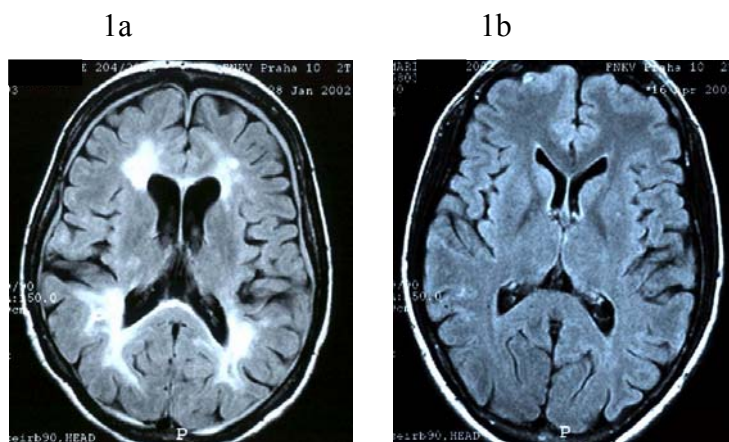
2.4 Diagnóza

Roztroušená skleróza zůstává klinickou diagnózou, která je založena na podrobné anamnéze a pečlivém neurologickém vyšetření. Podezření na toto onemocnění významně podporují abnormální výsledky tří pomocných vyšetření: magnetické rezonance (MR) mozku a míchy, vyšetření mozkomíšního moku a evokované potenciály.

MR je vyšetření, které je založeno na chování vodíkových protonů v silném magnetickém poli. Díky dobré rozlišovací schopnosti je MR schopna detekovat plaky v míše a mozku, zejména v okolí mozkových komor. Kromě toho MR může také zobrazit u

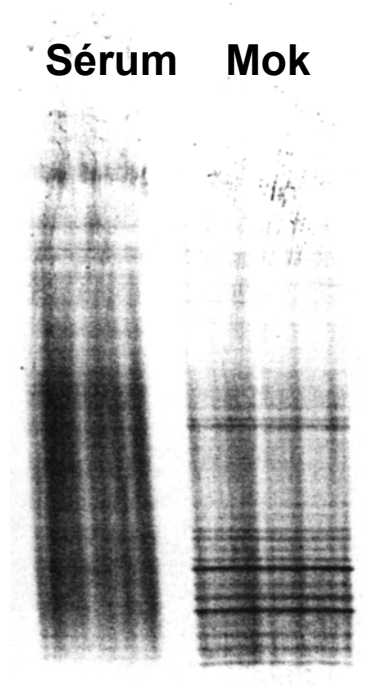
pacientů s roztroušenou sklerózou úbytek objemu mozkové tkáně – atrofii mozku (obr. 2.1 a, b).

Obr. 2.1a Typický obraz magnetické rezonance mozku pacientky s roztroušenou sklerózou: vícečetné splývající plaky a atrofie mozku
2.1b Shodný řez u stejně staré zdravé ženy k porovnání s postiženým mozkiem



Oligoklonální IgG pásy znamenají izoelektrickou fokusací rozdělené imunoglobuliny třídy G (IgG) pocházející z mozkomíšního moku (MMM). Každý pás je tvořen homogenní skupinou imunoglobulinů – protilátek, které jsou produkovány jednou populací identických B-lymfocytů (tzv. klonem). Imunoglobuliny se však mohou do MMM pasivně profiltrovat z krve. Autoimunitní produkce protilátek v kompartmentu CNS se tedy potvrdí imunoglobulinovými pásy z několika klonů (oligoklonálních) B-lymfocytů, které byly aktivovány v oblasti CNS do plazmatických buněk se sekrecí imunoglobulinů do MMM. Objeví se tedy v MMM jako vícečetné pásy, které nemají svůj sérový korelát (obr. 2.2).

Obr. 2.2 Přítomnost oligoklonálních IgG pásů v mozkomíšním moku, které nejsou v séru (vyšetření provedeno doktorandem při stáži v neuroimunologické laboratoři v Innsbrucku, Rakousko)



Evokované potenciály jsou vlastně zprůměrněním opakované elektroencefalografické odpovědi na podnět zrakový (VEP), sluchový (BAEP) nebo senzitivní (SEP). Naopak při korové stimulaci se snímá motorická odpověď při záškubu končetiny (MEP). Provokované odpovědi nastávají opožděně oproti zdravým jedincům, což je způsobeno pomalejším vedením po demyelinizovaných vláknech.

Nástup MR a tlak na brzké rozpoznání choroby a léčbu si vyžádal revizi diagnostických kritérií v roce 2001 (tab. 2.3) (McDonald a kol. 2001), upravené v roce 2005 (Polman a kol. 2005). Podle těchto kritérií zůstal základem klinický průkaz dvou a více exacerbací s objektivním neurologickým korelátem. Novinkou je zařazení nálezu vícečetných lézí na MR mozku do diagnostické mozaiky. Již při první příhodě klinických obtíží může být pomocí MR mozku nalezeno překvapivě mnoho plak kolem komor, a tak lze diagnostikovat roztroušenou sklerózu časně. Průkaz oligoklonálních

IgG pásů v mozkomíšním moku napomáhá především v situacích, kdy nejsou naplněny typické klinické a MR známky a při primárně progresivním průběhu. Význam evokovaných potenciálů různých modalit poklesl a omezil se jen na prodloužení latence zrakového evokovaného potenciálu.

Tab. 2.3 Nová diagnostická kritéria roztroušené sklerózy

Klinický obraz		Doplňující údaje potřebné k diagnóze roztroušené sklerózy
<i>Ataky</i>	<i>Objektivní známky léze (lézí)</i>	
2 nebo více	2 nebo více	žádné, klinická symptomatika je dostačující
2 nebo více	1	<ul style="list-style-type: none"> • roztroušenost v <u>prostoru</u> podle MR mozku <i>nebo</i> • 2 nebo více lézí na MR mozku kompatibilní s RS a pozitivní MMM <i>nebo</i> <ul style="list-style-type: none"> • další klinická ataka z jiné lokalizace
1	2 nebo více	<ul style="list-style-type: none"> • roztroušenost v <u>čase</u> na MR mozku <i>nebo</i> • druhá klinická ataka
1 (mono-symptomatická)	1	<ul style="list-style-type: none"> • roztroušenost v <u>prostoru</u> podle MR mozku <i>nebo</i> • 2 nebo více lézí na MR mozku kompatibilní s RS a pozitivní MMM <p style="text-align: center;"><i>a</i></p> <ul style="list-style-type: none"> * roztroušenost v <u>čase</u> podle MR mozku <i>nebo</i> * další klinická ataka z jiné lokalizace
0 (progrese od začátku)	1	<ul style="list-style-type: none"> * pozitivní MMM <p style="text-align: center;"><i>a</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • roztroušenost v <u>prostoru</u> podle MR mozku s 9 nebo více T2 váženými lézemi • <i>nebo</i> 2 nebo více lézí míchy <i>nebo</i> 4-8 mozkových a 1 míšní léze • <i>nebo</i> pozitivní VEP se 4-8 MR lézemi • <i>nebo</i> pozitivní VEP s méně než 4 mozkovými lézemi + 2 míšní léze <p style="text-align: center;"><i>a</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ roztroušenost v <u>čase</u> podle MR <i>nebo</i> trvalá progrese po dobu 1 roku

Pozn.

Paraklinická podpora diagnózy roztroušené sklerózy

Co je pozitivní MR (roztroušenost v prostoru) ?

3 ze 4 následujících položek :

- 1 léze zvýrazněná po podání gadolinia nebo 9 T2 vážených lézí pokud není přítomna žádná postkontrastní léze
- 1 nebo více infratentoriálních lézí
- 1 nebo více juxtakortikálních lézí
- 3 nebo více periventrikulárních lézí

Pozn. 1 míšní léze může nahradit 1 mozkovou lézi

Co poskytuje MR důkaz roztroušenosti v čase?

- léze zvýrazněná po podání gadolinia na MR mozku nejméně 3 měsíce po začátku klinické ataky v jiné lokalizaci než by odpovídalo atace

nebo

- pokud nejsou přítomny postkontrastní léze na MR mozku nejméně 3 měsíce po začátku obtíží, následující MR vyšetření po 3 měsících by mělo prokázat postkontrastní lézi nebo novou T2 váženou lézi

Co je pozitivní mozkomíšním mok (MMM)?

průkaz oligoklonálních IgG pásů v mozkomíšním moku, které nejsou v séru *nebo* zvýšený IgG index

Co jsou pozitivní VEP ?

opožděná, ale tvarově zachovaná vlna P 100

2.5 Léčba

Zotavení z ataky se urychluje nitrožilně podávaným methylprednisolonem (Solu-Medrol) v celkové dávce 3-5 g v průběhu 3-10 dnů. Následuje perorální léčba Prednisonem nebo Medrolem v sestupných dávkách. Při léčbě Prednisonem se začíná dávkou 1 mg/kg váhy a snižuje o 5 mg týdně na výsledných 5-10 mg denně, někdy v alternujícím režimu. Protože víme, že aktivita onemocnění probíhá i mezi atakami, podávají se steroidní preparáty nebo jiné imunosupresivní léky (azathioprin –Imuran, methotrexat – Methotrexat aj.) trvale. Od roku 1996 byly u nás postupně uváděny všechny modernější substance zasahující cíleněji do porušeného imunitního systému. Jsou to interferony beta, které se jako přirozeně se vyskytující molekuly jinak uplatňují při tlumení virové infekce a antagonizují “prozánětlivý účinek” interferonu gama. K dispozici jsou tři preparáty: Avonex podávaný nitrosvalově 1x týdně, Betaferon podkožně obden a Rebif podkožně pondělí-středa-pátek. Zcela odlišným mechanismem působí další substance – glatiramer acetát (Copaxone), který “přeladuje” imunitní systém do převahy

protizánětlivých mechanismů. Aplikuje se podkožně každý den. U glatiramer acetátu a interferonu typu beta byla opakovaně ověřena účinnost při klinickém i MR sledování pacientů s roztroušenou sklerózou. Při nepříznivém průběhu i přes výše uvedenou léčbu je možné volit agresivnější způsoby imunosuprese (infúzní mitoxantron nebo cyklofosfamid v kombinaci s methylprednisolonem v 1-3měsíčních intervalech) nebo imunomodulace (intravenózní imunoglobuliny). Jako poslední záchrana pro pacienty s maligním průběhem nereagující na klasickou léčbu lze vybraným pacientům nabídnout autologní transplantaci kostní dřeně po odstranění autoreaktivních buněk. Významnou součástí komplexní léčby je specificky zaměřená rehabilitace a podávání symptomatických léků (analgetik, myorelaxancií, antidepresiv apod.). Různorodá paleta terapeutických možností především v časných stádiích onemocnění nabízí dnes pacientům daleko povzbudivější vyhlídky, než tomu bývalo dříve.

3 Humorální imunita u roztroušené sklerózy

Roztroušená skleróza je původně považovaná za autoimunitní chorobu zprostředkovanou buněčnými mechanismy. Význam humorální složky je nejlépe dokladován intratekální IgG syntézou, která je obecným rysem chronického zánětu CNS a která našla diagnostického uplatnění u RS. Konstantním rysem v mozkomíšním moku u pacientů s RS je intratekální syntéza imunoglobulinů IgG produkovaných plazmatickými buňkami. Intratekální syntéza se prokazuje přítomností oligoklonálních IgG pásů v mozkomíšním moku nebo zvýšeným IgG indexem (Andersson a kol. 1994; Freedman a kol. 2005; Deisenhammer a kol. 2006). Oligoklonální pásy IgG v mozkomíšním moku bez sérového korelátu vykazují až

95 % senzitivitu, zatímco zvýšený IgG index bývá u 50-80 % pacientů s prokázanou RS (Andersson a kol. 1994).

B buňky, plazmatické buňky, komplementové produkty a různé protilátky byly nalezeny v lézích RS, v séru nebo mozkomíšním moku (Archelos a kol. 2000; Cross a kol. 2001; Cross a Stark 2005; Teunissen a kol. 2005). Protilátky mohou být součástí obecné „nesmyslné“ protilátkové odpovědi, autoimunitní reakcí na nějaký antigen nebo se může při jejich tvorbě uplatňovat fenomén zvaný molekulární mimikry (viz níže). 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) (Reiber a Lange 1991; Štourač a Bednářová 2000; Bednářová a kol. 2005), lidský herpesvirus typ 6 (Derfuss a kol. 2005) a jiná infekční agens – *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp* (Hughes a kol. 2001; Ebringer a kol. 2005), *Chlamydia pneumoniae* (Yao a kol. 2001)

2. *vlastní* - autoantigeny neuronů nebo oligodendrocytů (Archelos a kol. 2000; Cross a kol. 2001; Almeras a kol. 2004; Teunissen a kol. 2005):

- myelinové proteiny a komplexní molekuly – myelinový bazický protein (MBP), myelinový oligodendrocytární glykoprotein (MOG), protein asociovaný s myelinem (MAG), proteolipidový protein (PLP), sulfatidy, gangliosidy (Acarin a kol. 1996; Sadatipour a kol. 1998; Genain a kol. 1999; Berger a kol. 2003; Markovic a kol. 2003; Dharmasaroja 2003; Lily a kol. 2004; Bitsch a kol. 2004)
- axonální proteiny – tubulin, neurofilamenta (Hughes a kol. 2001; Silber a kol. 2002; Eikelenboom a kol. 2003; Ehling a kol. 2004)

3. *ostatní* – např. antikardiolipinové protilátky, protilátky proti nukleárním a tyreoidálním mikrosomálním antigenům, protilátky proti bílkovinám tepelného šoku tzv. heat shock proteins, protilátky proti proteazomu, Nogo-A, jadernému ribonukleoproteinu, dvojšroubovici DNA, synapsinu (Heinzlef a kol. 2002; Mayo a kol. 2002; Reindl a kol. 2003; Almeras a kol. 2004; Cid a kol. 2004; Reder a Oger 2004; Sueoka a kol. 2004; Lily a kol. 2004; Bitsch a kol. 2004; Chiba a kol. 2006)

4. *neznámé „nesmyslné“ specifity*

Na hledání specifity intratekálních a sérových imunoglobulinů bylo vynaloženo velké úsilí, ale antigenní cíl převažující části intratekálních protilátek není dosud jasný. Z četných studií vyplývá velká heterogenita protilátek. Jedním z vysvětlení je fenomén tzv. rozšiřování epitopů. Po úvodní zánětlivé příhodě se uvolněním nových antigenů může aktivovat aureaktivní buněčná a humorální imunitní odpověď, která zahrnuje další myelinové a nemyelinové antigeny nebo epitopy (Havrdová a kol. 2001). Protilátky mohou vznikat jako autoimunitní duální reakce na různé antigeny se strukturální podobností fenoménem tzv. molekulárních mimikry. Podle tohoto konceptu jsou protilátky vytvářeny v důsledku přítomnosti exogenních struktur, např. peptidů odvozených od virových partikulí nebo bakterií. Takové protilátky mohou zkříženě reagovat s neuronálními antigeny (Wekerle a Hohfeld 2003; Hughes a kol. 2003; Prat a Antel 2005).

Není jasné, zda B buněčná odpověď je výsledkem určité charakteristické reakce v rámci RS vyvolávané přítomností antigenu nebo zda se jedná o nespecifickou polyklonální B-buněčnou aktivaci bez vazby na RS. Zdá se, že alespoň část imunitní reakce je vyvolávána antigenem (Qin a Duquette 2003). V jiných pozorováních byla zjištěna u pacientů s RS zvýšená frekvence buněk produkujících protilátky proti MBP nebo PLP (Sellebjerg a kol.

2000). Protilátky proti MOG a MBP byly detekovány na povrchu plazmatických buněk v mozku, v oblastech demyelinizace a na myelinových složkách v poškozené mozkové tkáni. Tyto nálezy podporují představu, že při demyelinizaci a tvorbě léze je důležitá infiltrace plazmatickými buňkami produkujícími anti-MOG a anti-MBP protilátky a lokální sekrece autoprotilátek (Genain a kol. 1999).

Adaptivní (specifická) imunita vzniká v periferních lymfatických orgánech, jmenovitě v lymfatických uzlinách, slezině a na sliznicích. Zralé naivní T- a B-lymfocyty opouštějí své zárodečné orgány (tymus a kostní dřev) a krevním oběhem jsou zanášeny do periferních lymfatických orgánů, kde jsou cizorodé antigeny vycitávány a koncentrovány. Výsledkem adaptivní imunitní odpovědi je vznik efektorových a paměťových buněk vč. plazmatických a paměťových B buněk vytvářejících protilátky (Hořejší a Bartůňková 1998; Havrdová a kol. 2001). Vysoce afinitní B-lymfocyty přetrvávají, zatímco nízkoafinitní buňky nemohou vázat antigen a zahynou apoptózou. Takto vyselektované B-lymfocyty se diferencují do přechodných plazmatických buněk produkujících protilátky a do dlouhodobě přítomných paměťových plazmatických buněk, které přetrvávají v lymfatických uzlinách, slezině a kostní dřev. V podmínkách přetrvávající antigenní stimulace proliferují klony paměťových B-lymfocytů, což může udržovat produkci antigenně specifických protilátek v tkáni, séru a mozkomíšním moku. Proto klony B buněk vyžadují antigen pro setrvávání a při chybění antigenů se vytrácejí z hostitele. U většiny pacientů s RS s časnou nebo chronickou fází choroby se zjistila klonální expanze B lymfocytů (Qin a Duquette 2003). Buněčný profil v mozkomíšním moku u pacientů s RS může souviset s dalším osudem nemocných. Poměr mezi B lymfocyty a monocyty odpovídá progresi choroby a je

nezávislý na míře invalidizace nebo trvání choroby. Vysoký poměr (převaha B lymfocytů) byl sdružen s rychlejší progresí, zatímco nízký poměr (převaha monocytů) se týkal pacientů s pomalou progresí (Cepok a kol. 2001).

4 K čemu jsou protilátky u roztroušené sklerózy dobré?

Protilátky můžeme využívat při studiu **patogeneze** RS a **vizualizaci v imunohistochemii** (Ferguson a kol. 1997; Trapp a kol. 1998). Intratekální syntéza imunoglobulinů – protilátek - je důležitou podporou pro **diagnózu RS** (Freedman a kol. 2005; Deisenhammer a kol. 2006). Protilátky u RS mohou být ukazatelem choroby jako její **sekundární epifenomén**, mohou být **primárně patogenní** nebo naopak **protektivní** (Martino a kol. 2002). Jedním z možných patogenetických mechanismů RS je protilátkově vázaná demyelinizace (Lucchinetti a kol. 2000). S tím může souviset příznivý efekt intravenózních imunoglobulinů a plazmaferézy při **léčbě** RS (Sorensen 2003; Keegan a kol. 2005). Specifická vazba protilátek k antigenům v mozkové tkáni může způsobit poškození několika mechanismy:

1. aktivace komplementové kaskády
2. opsonizace a fagocytóza buněk
3. interference s normálními buněčnými funkcemi vazbou protilátek na fyziologicky důležité molekuly a buněčné receptory (Qin a Duquette 2003).

Vazbou protilátky na neuronální antigen se může spustit komplementová kaskáda vedoucí k produkci komplexu atakujícího membránu, který způsobí lýzu a zánik buňky. Protilátky ve vazbě na antigen mohou sloužit svou Fc oblastí k připojení Fc receptoru makrofágů, neutrofilů a NK buněk (tzv. přirození zabíječi – natural killers), které zprostředkují buněčnou cytotoxicitu závislou na

protilátkách (Hořejší a Bartůňková 1998; Havrdová a kol. 2001). Protilátky se také mohou účastnit vyvazování a neutralizace autoantigenů a hrát roli v reparačních procesech (Martino a kol. 2002; Warrington a kol. 2000).

Cílem klinického využití protilátek je zpřesnění diagnózy, identifikace rizikovějších pacientů, prognózování dalšího osudu nemocného a vliv na výběr léčebné strategie. Lze přitom sledovat dva hlavní směry.

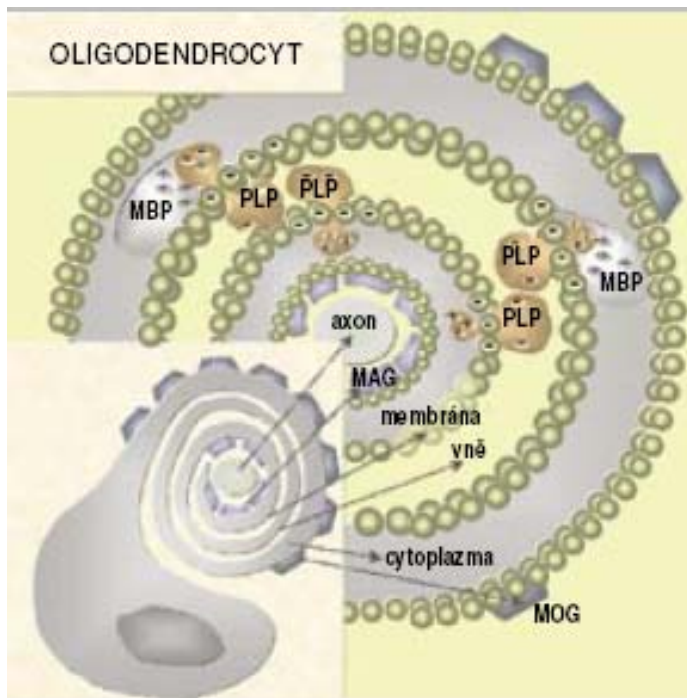
V rámci prvního principu se jedná o informace získávané z celkové protilátkové odpovědi bez ohledu na specifitu. Pacienti s RS se zvýšeným IgG indexem (zvýšenou intratekální syntézou celkových IgG protilátek) mohou mít vyšší riziko progresu choroby (Izquierdo a kol. 2002). Pacienti s intratekální syntézou IgM protilátek mají větší pravděpodobnost konverze do roztroušené sklerózy, častější ataky a horší průběh s větší invalidizací než pacienti bez intratekální IgM syntézy (Villar a kol. 2003). Pacienti po klinicky izolovaném syndromu s prokázanou intratekální syntézou oligoklonálními IgG mají větší riziko zvratu do RS. To je užitečná informace na počátku onemocnění, zvl. s normálním nálezem na MR mozku (Sastre-Garriga a kol. 2003).

Druhým přístupem je hledání autoprottilátek proti specifickým strukturám. Současný výskyt protilátek proti virům spalniček, zarděnek a varicella-zoster (MRZ) u jedné osoby s jiným onemocněním než RS je nepravděpodobný, což se může uplatňovat v diferenciální diagnostice autoimunitních onemocnění. Tato tzv. MRZ reakce doplňuje výsledek oligoklonálních pásoů o větší specifitu pro onemocnění RS (Reiber a Lange 1991; Štourač a Bednářová 2000; Bednářová a kol. 2005). Jiným typem imunoglobulinů jsou protilátky proti neuronálním autoantigenům – antimyelinové a antiaxonální protilátky.

5 Antimyelinové protilátky u roztroušené sklerózy

Možnými terči pro protilátky u RS jsou myelinové nebo oligodendrocytární proteiny, a to takové, které jsou na povrchu dobře přístupné imunitnímu systému. Mezi takové potenciální kandidáty patří: myelinový bazický protein, proteolipidový protein, glykoprotein sdružený s myelinem, 2',3'-cyklická nukleotid 3'-fosfodiesteráza a myelinový oligodendrocytární glykoprotein (Krejsek a kol. 2002) (obr. 5.1).

Obr. 5.1. Schématické znázornění rozmístění hlavních proteinů v myelinové pochvě (převzato z Krejsek a kol. 2002)



Myelinový bazický protein (MBP) tvoří největší, asi 30% podíl mezi myelinovými proteiny a je tradičně považován za hlavní cíl imunitní odpovědi u RS. Výsledky detekce sérových a mozkomíšních protilátek proti MBP u pacientů s RS jsou rozporuplné, i když se převážně našly ve zvýšené míře u pacientů s RS než u zdravých jedinců. Je to dáno jednak různými imunochemickými metodikami detekce protilátek a zřejmě i různými

populacemi pacientů s RS. Četnost anti-MBP protilátek vzrůstá u pacientů s RS po první atace (12 %) do období relaps-remitujícího (32 %) a dále v chronické progresi (40 %). Jsou považovány za ukazatel neurologického poškození spíše než za primární příčinu (Vincent a kol. 1999; Reindl a kol. 1999; O'Connor a kol. 2003).

MBP a PLP jsou v kompaktním myelinu a obtížně přístupné imunitnímu systému. Přestože **myelinový oligodendrocytární glykoprotein (MOG)** zaujímá pouze malou část myelinových proteinů (nejvíce 0.05 %), tento glykoprotein může být důležitým imunitním terčem u RS (Reder a Oger 2004).

MOG je specifickým proteinem CNS, je lokalizován výlučně na zevní části oligodendroglialní membrány a myelinu a je silně imunogenní. U řady pacientů s RS se našly protilátky proti extracelulární části MOG s převahou IgM třídy. Protilátky MOG se vyskytují v séru a mozkomíšním moku u 1/3 pacientů již v době první ataky RS. Protilátky jsou přítomny ve stabilním titru a ve stejné četnosti u všech stádií RS. Reakce proti MOG se objevuje i u meningitid. U nich však protilátky časem vymizí, zatímco u RS je anti-MOG index stále vysoký (Reindl a kol. 1999).

Prvním skutečně praktickým uplatněním protilátek u RS byla studie, která se zaměřila na možnost předpovídat vývoj pacientů s tzv. klinicky izolovaným syndromem (kap. 2.3) do klinické jisté RS na podkladě přítomnosti protilátek proti MOG a MBP. Pacienti se sérovými anti-MOG a anti-MBP protilátkami měli relapsy častěji a dříve než pacienti bez těchto protilátek. Séropozitivní pacienti pro obě protilátky vyvinuli druhou atakou klinicky jistou RS častěji (95 % vs 23 %) a dříve (7 měsíců vs 45 měsíců) oproti séronegativním pacientům (Berger a kol. 2003). Zdálo se, že stanovení protilátek proti MOG by mohlo být užitečným nástrojem k identifikaci pacientů s CIS, kteří jsou vystaveni vyššímu riziku časné konverze do klinické jisté RS. Další studie však toto zjištění nepotvrdila (Lim a kol. 2005). Následné průřezové studie zabývající se porovnáním pacientů s RS a kontrol z hlediska anti-MOG protilátek přinesly

rozporuplné výsledky. Protilátky proti MOG jsou v mozkomíšním moku pacientů s RS zvýšeny (30 %) ve srovnání s kontrolními jedinci (8 %) (Markovic a kol. 2003). Sérové protilátky proti nativnímu glykosylovanému MOG byly měřeny ELISA metodou u pacientů s RS a kontrolních jedinců. Anti-MOG protilátky byly zvýšené u pacientů s CIS. Vyšší anti-MOG IgG protilátky byly nalezeny u pacientů s atakou a u sekundárně progresivních pacientů s RS při srovnání s pacienty v remisi nebo zdravými kontrolami (Gaertner a kol. 2004). Naproti tomu sérové anti-MOG protilátky měřené RIA metodou v kapalně fázi ve třídě IgM i IgG byly nalezeny se stejnou četností u pacientů s RS a zdravých jedinců (Lampasona a kol. 2004). Tyto diskrepance lze vysvětlit rozdílnými populacemi pacientů, použitím různých antigenů – rekombinantních (Berger a kol. 2003; Lampasona a kol. 2004) nebo nativních (Gaertner a kol. 2004) MOG a stanovování různými technikami – westernblot (Berger a kol. 2003), ELISA (Gaertner a kol. 2004) a RIA v kapalně fázi (Lampasona a kol. 2004). Rekombinantní proteiny neobsahují posttranslační modifikace (jako např. fosforylace či glykosylace), které mohou měnit významně terciární strukturu bílkoviny nezbytnou pro vazbu protilátek. Proto použití nativního a rekombinantního proteinu může dávat různé výsledky. Bude tedy třeba vyčkat dalších studií, zda antimyeliové protilátky mají předpovědní hodnotu u pacientů manifestujících se CIS.

6 Cytoskelet neuronů

O existenci cytoskeletu se ještě před 30 lety nevědělo. Dnes je cytoskeletální princip obecně přijímanou součástí struktury a funkce buněk. I když název cytoskelet vzbuzuje představu pevné a neměnné struktury, jde o vysoce dynamický systém. Cytoskelet není jen buněčná kostra, ale také pohybový a organizační systém. Charakteristickým rysem jeho proteinů je schopnost rychle

polymerovat do vláken, která mohou být stejně rychle depolymerována. Cytoskelet je tedy proměnlivá síť. Jeho proteiny zajišťují tvar a pružnost buňky, účastní se různých druhů buněčného i vnitrobuněčného pohybu a zprostředkovávají kontakt s buněčnými organelami od jádra po buněčnou membránu. Pro diagnostické použití je předurčuje tkáňová, resp. buněčná specifita a velké množství v buňce (až 40 % ze všech buněčných bílkovin) (Dráberová 2000). Příkladem využití těchto atributů je troponin v séru. Jedná se o cytoskeletální protein srdečních buněk, který se již rutinně používá v klinické interní praxi jako podpora při diagnostice akutního infarktu myokardu (Friedecký a kol. 2000; Tichý a Gregor 2002). Ukazatel odrážející rozpad neuronů za různých patologických stavů by mohl být podobně založen na nervově specifických cytoskeletálních proteinech. Další předností je fylogeneticky vysoce konzervativní povaha těchto bílkovin. Příkladem může být kvasinkový tubulin, který má velmi podobný sled aminokyselin jako lidský tubulin (Dráberová 2000). Počítačová analýza sledu aminokyselin prokázala 78-81% homologii mezi hovězí a lidskou, lidskou a potkaní, potkaní a hovězí lehkou podjednotkou neurofilament (Yano a kol. 2005). Proto při studiu lze dobře pracovat i s jiným než lidským materiálem, aniž by docházelo k přílišnému zkreslení.

Mezi základní stavební proteiny cytoskeletu patří: mikrotubuly, mikrofilamenta (nazývaná také aktinová vlákna) a střední filamta. Vnější průměr válcových mikrotubulů je 24 nm a dvouvláknová šroubovice mikrofilament má průměr kolem 7 nm. Svůj název střední filamta získala tím, že průměr těchto vláken je 10 nm, tedy mezi průměrem dvou předchozích struktur (Dráberová 2000).

Mikrotubuly a mikrofilamenta mají mnoho společných rysů stejných u všech živočichů, hub a rostlin. Skládají se z globulárních proteinů (tubulin, aktin), které polymerují do válcových (mikrotubuly) nebo vláknitých (mikrofilamenta) struktur. Tubulin i

aktin se nacházejí v buňce ve formě monomerní a polymerní. To umožňuje rychlou přestavbu cytoskeletální sítě podle okamžitých potřeb buňky. Mikrotubuly a aktinová vlákna podléhají neustálému zkracování a prodlužování polymerací a depolymerací. Na stavbě mikrotubulů a mikrofilament se podílejí kromě tubulinu a aktinu také asociované proteiny. Proteiny asociované s mikrotubuly (microtubule-associated proteins MAPs) propojují mikrotubuly mezi sebou nebo s mikrofilamenty a středními filamenti, zajišťují interakce s buněčnými organelami i plazmatickou membránou a ovlivňují rychlost polymerace mikrotubulů. Patří mezi ně tau protein. Mikrotubuly vykazují vysoký stupeň homologie. Tubuliny odlišných druhů a různých tkání jsou si velice podobné (Dráberová 2000).

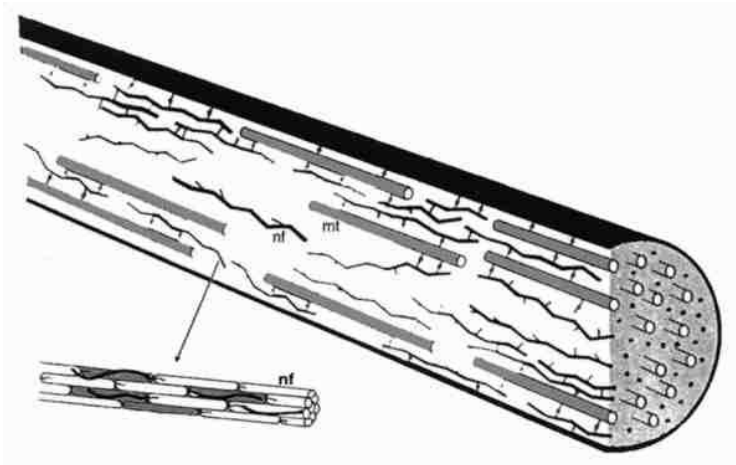
Neuronální tkáň je ze všech živočišných tkání nejbohatší na tubulin, protože axony i dendrity jsou plné mikrotubulárních svazků. Po mikrotubulech zde probíhá transport nového materiálu (proteinů, membrán, synaptických měchýřků, neurotransmiterů apod.) z oblasti jejich syntézy v těle buňky na synaptický konec výběžku. V opačném směru jsou zase přepravovány např. „staré“ membrány, které degradují v lyzozomech těla neuronu. Tento transport, který překonává i metrové vzdálenosti, umožňují mikrotubulární motory. Kineziny zajišťují transport od centra k periférii, zatímco dyneiny vezou struktury opačným směrem (Dráberová 2000).

Střední filamenta

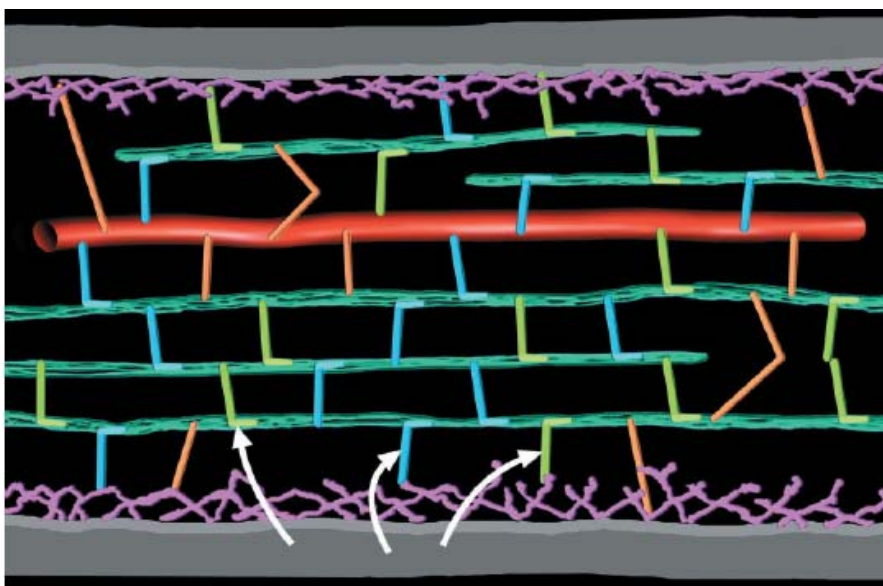
Střední filamenta zajišťují mechanickou podporu a pružnost buněk a tkání. Od mikrotubulů a aktinových vláken se liší v několika ohledech. Jsou méně dynamická a tvoří relativně stabilní síť anastomozujících vláken navzájem a s mikrotubuly se spojují pomocí proteinů asociovanými s mikrotubuly (tzv. MAPs) (obr. 6.1, 6.2). Neúčastní se žádné formy pohybu. Není známa volná hotovost jejich bílkovin v buňce. Jsou nerozpustná. Nejsou tvořena jedním

univerzálním proteinem, ale mnoha základními stavebními bílkovinami. Přes odlišnosti stavebních bílkovin je struktura všech středních filament podobná. Proteiny mají obdobnou středovou oblast a liší se C- a N- koncovými částmi (Lee a Cleveland 1996; Julien 1999; Dráberová 2000).

Obr. 6.1 Schéma uspořádání mikrotubulů (mt) a neurofilament (nf) v axonu



Obr. 6.2 Detailní zapojení mikrotubulů (červeně) s neurofilamenty. Lehká podjednotka tvoří osu (zeleně), ke které se připojují středně těžké a těžké řetězce neurofilament (světle modré a zelené) (převzato z Lariviere a Julien 2003).



Přítomnost proteinů středních filament je charakteristická pro určitou tkáň nebo buněčný typ (tab. 6.1). V gliích je zastoupen **kyselý gliální fibrilární protein (GFAP)**. Proteiny **neurofilamentového tripletu** jsou typickou součástí neuronů a podílejí se s mikrotubuly na stavbě axonů. Společně s jinými cytoskeletálními proteiny tvoří síť, která určuje průměr a tvar axonu a slouží k upevnění jiných složek cytoplazmy (Dráberová 2000).

Tab. 6.1 Přehled cytoskeletálních proteinů

druh vlákna	průměr	bílkovina	výskyt ve tkáních/buňkách
<i>mikrotubuly</i>	25 nm	alfa a beta tubulin	většina buněčných typů
<i>střední filamenta</i>	10 nm	keratin vimentin desmin GFAP <i>neurofilamentový triplet</i> lamin	epitelie mezenchymové buňky svaly astrocyty <i>nervové buňky</i> jaderná membrána
<i>mikrofilamenta</i>	5 nm	alfa, beta, gama aktin smoothelin	příčně pruhované, hladké svalstvo, většina buněčných typů

K poruchám axonálního cytoskeletu dochází u řady chorob: roztroušená skleróza, Alzheimerova nemoc, nemoc s difúzními Lewyho tělísky, amyotrofická laterální skleróza, neuropatie Charcot-Marie-Tooth aj. (tab. 6.2) (Gotow 2000; Brandt 2001; Lariviere a Julien 2003).

Tab. 6.2 Poruchy cytoskeletu u neuropsychiatrických onemocnění

přerušný axonální cytoskelet, porucha axonálního transportu:

roztroušená skleróza

neurofilamenta: amyotrofická laterální skleróza (agregáty), neuropatie Charcot-Marie-Tooth, Parkinsonova choroba (agregáty), nemoc s difúzními Lewyho tělísky

tau protein (inkluzie): Alzheimerova choroba, frontotemporální demence, parkinsonismus sdružený s chromozomem 17, Pickova choroba (+neurofilamenta), kortikobazální degenerace (+neurofilamenta), progresivní supranukleární obrna, opakované úrazy hlavy

desorganizace mikrotubulární sítě: dystonia musculorum, Huntingtonova choroba

Některé poznatky získané při studiu cytoskeletu se již běžně užívají v lékařství. Při léčbě nádorových onemocnění se využívá mikrotubulárních inhibitorů. V ovlivněných buňkách zůstávají mikrotubuly nezměněny, jejich dynamika je však zablokována. Buňkám proto chybí aparát pro rozdělení chromozómů do dceřinných buněk, což se uplatňuje u rychle se dělících buněk. Tak se zastavuje dělení nádorových buněk. Nejznámější kolchicin brání polymeraci mikrotubulů, vinblastin a taxol stabilizují mikrotubuly. Dystrofin je asociovaný protein mikrofilament sloužící k interakci s plazmatickou membránou. Jeho nedostatek vyvolává Duchennovu chorobu. Faloidin stabilizuje mikrofilamenta, a tak ustává pohyb uvnitř buňky a její lokomoce (Dráberová 2000). V histopatologii lze pomocí anti-neurofilamentových protilátek přesněji identifikovat nádory ektodermálního původu vycházející z neuroblastu (x gliomům) (meduloblastomy, neurinomy, ganglioneurinomy, gangliogliomy, ganglioneuroblastomy a neuroblastomy,

paragangliomy, feochromocyty, gangliocyty). Mezi další příklady filamentopatie patří mutace desminu (hlavní střední filamentum svalů) způsobující recesivní distální myopatii a mutace plektinu vede ke svalové dystrofii a bulózní epidermolýze.

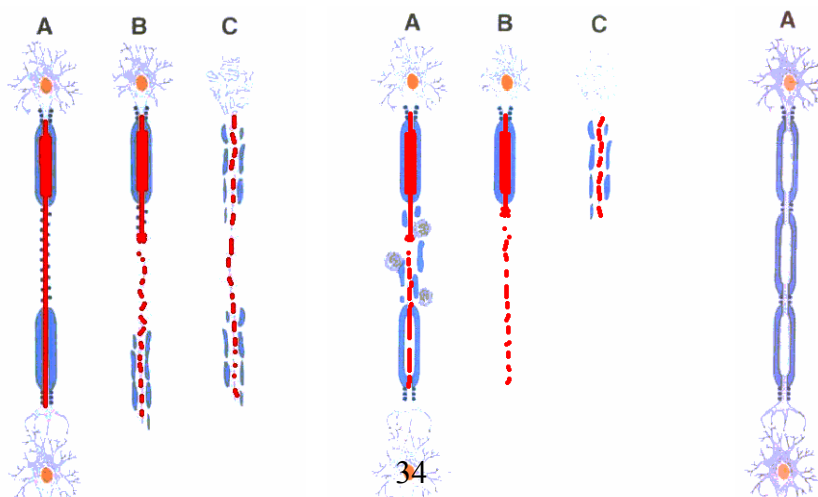
7 Axonální postižení u roztroušené sklerózy

Roztroušená skleróza je onemocnění CNS, které poškozuje myelin, oligodendrocyty, neurony a axony. Demyelinizace se dlouho tradovala jako hlavní rys lézí CNS, zatímco axonální patologie byla opomíjena. Přestože byla u roztroušené sklerózy axonální patologie a ztráta axonů zachycena již v prvních histopatologických nálezech, byla dlouho považována za nález pozdních stadií choroby nebo za následek relativně těžkých lézí. Degenerace axonů se připisovala až neaktivním, chronickým, „vyhaslým“ lézím.

Vlnu velkého zájmu o axonální problematiku spustily nové imunohistochemické průkazy přetrhání axonu a nálezy na magnetické rezonanci (MR) mozku a míchy (Bjartmar a kol. 2003; Pitřha a Havrdová 2005). Histopatologická vyšetření ukázala rozšíření koncových částí přerušovaných axonů pomocí protilátek proti amyloidovému prekursorovému proteinu nebo neurofilamentům (Ferguson a kol. 1997; Trapp a kol. 1998). Míra axonálního zpřetrhání koreluje s intenzitou zánětu a je nejvyšší v aktivních demyelinizačních lézích (odhaduje se na 11 tisíc zpřetrhaných axonů v 1 mm³ tkáně) (Trapp a kol. 1998). Trvalé axonální poškození menšího stupně probíhá v neaktivních placích. Počáteční axonální poranění je těsně spjata se zánětem, ale není omezeno jen na samotné léze. Poškození se šíří v nervovém systému anterográdní Wallerovou, retrográdní nebo transsynaptickou degenerací (obr. 7.1, 7.2) (Brück 2005). I v normálně vyhlížející bílé hmotě se trhá 17 axonů oproti kontrolní bílé hmotě s jedním přetrženým axonem v 1 mm³ tkáně (Trapp a kol. 1998). Největší axonální ztráta nastává již

v časných stádiích onemocnění (Kuhlman a kol. 2002). V několika histopatologických studiích míchy se prokázala snížená hustota nejen axonálních vláken ve zcela demyelinizovaných nebo částečně demyelinizovaných okrcích, ale také v tzv. normální bílé hmotě bez zánětlivých známek. Navíc se překvapivě zjistilo, že menší axonální hustota byla ve stejné míře jak v zánětlivých ložiscích, tak i v tzv. normální bílé hmotě míchy. Vysvětlení můžeme najít ve Wallerově degeneraci, probíhající distálně od ložiskové zánětlivé demyelinizace a axonálního přerušení (obr. 7.1, 7.2) (Lovas a kol. 2000; Bergers a kol. 2002). U mladého pacienta s krátce trvající roztroušenou sklerózou a úmrtím na respirační selhání při rozsáhlé kmenové place se prokázala axonální ztráta v descendentních, pyramidových drahách v tzv. normálně vyhlížející bílé hmotě míšni, nikoli však v ascendentních senzitivních drahách. Zároveň se zjistilo, že myelinové pochvy bez axonálního obsahu byly dobře zachovány. CNS myelin může přetrvávat léta a přispívat k normálnímu vzhledu postižené bílé hmoty při běžném barvení na myelin a na MR (Bjartmar a kol. 2001). Znamená to, že axonální ztráta je silně podhodnocována. Zánik axonů může být tedy důsledkem a) dlouhodobé demyelinizace, b) zánětu s demyelinizací a s přetrháním axonů, c) může probíhat dokonce i bez primární poruchy myelinu (obr. 7.1).

Obr. 7.1 Vztah rozpadu myelinu a axonu po dlouhodobé demyelinizaci (panel vlevo), v zánětlivém ložisku destrukce současně myelinu a axonu (panel uprostřed) a izolovaný zánik axonálního obsahu bez porušení myelinu (panel vpravo) (upraveno podle Trapp a kol. 1999).

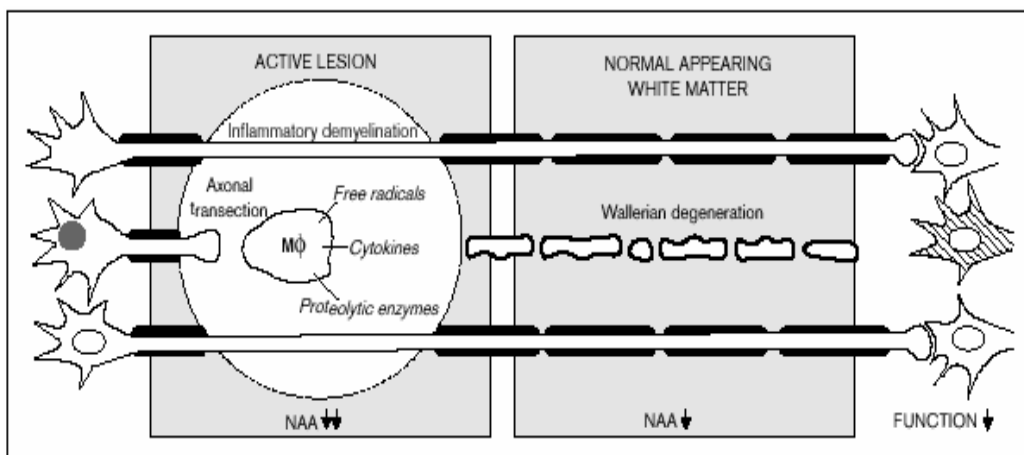


U pacientů s roztroušenou sklerózou lze axonální poškození předpokládat i podle určitých magneticko-rezonančních (MR) známek. Pomocí histopatologického vyšetření se ověřilo, že T1 vážené léze tzv. černé díry představují okrsky s významným zánikem axonů. Atrofie míchy, částí mozku (corpus callosum, zvětšení komorového objemu) i celého mozku a její rychlejší úbytek u pacientů s roztroušenou sklerózou oproti zdravým jedincům je kromě jiného také důsledkem zániku axonů (van Walderveen a kol. 1998; Bitsch a kol. 2001; Evangelou a kol. 2000; Miller a kol. 2002). Řada složitých nových technik MR (MR spektroskopie, tensorové měření, difúzně vážené měření) je schopna detekovat a odhadovat axonální patologii u pacientů s roztroušenou sklerózou, a to již v časných fázích onemocnění (Filippi a kol. 2001; Miller a kol. 2003; Rovaris a kol. 2005). Nové MR přístroje se silným magnetickým polem a moderní techniky MR nám umožňují zobrazit léze dokonce v šedé hmotě a kvantifikovat in vivo rozsah a míru patologie šedé hmoty, která koreluje pouze středně s rozsahem postižení bílé hmoty. Alespoň část patologie šedé hmoty u roztroušené sklerózy není důsledkem retrográdní degenerace vláken procházejících skrze léze bílé hmoty (Filippi a Rocca 2005). Zdálnivě normální bílá a šedá hmota mimo plaky při konvenčním zobrazení MR je rovněž postižena axonální patologií. Protonová MR spektroskopie prokázala sníženou koncentraci N-acetylaspartátu (ukazatel neuronů) nejen v lézích, ale i mimo ně (obr. 7.2) (De Stephano a kol. 2005).

Všechna tato pozorování nutí přehodnotit koncept RS jako ložiskového, zánětlivého a demyelinizačního onemocnění bílého hmoty. Ohraničené, makroskopické léze jsou jen špičkou ledovce patologie RS. Neurodegenerativní komponenta s axonálním podílem postihuje jak ložiska, tak zdánlivě normální tkáň v bílé i šedé hmotě CNS od velmi časných stadií RS. RS je tedy difúzní onemocnění celého CNS s důležitou neurodegenerativní složkou. Axonální

poranění je nevratné a kumulativní a může být podkladem trvalého nebo narůstajícího neurologického deficitu u pacientů s RS.

Obr. 7.2 Podklad nálezu snížené koncentrace N-acetylaspartátu jako ukazatele přerušení axonu v místě zánětlivého ložiska a Wallerovy degenerace distálně od ložiska v normálně vyhlížející bílé hmotě (převzato z Bjartmar a kol. 2003).



Mechanismus axonálního přerušení u roztroušené sklerózy

Strukturální funkcí axonu je udržovat tvar, průměr a odolnost. Hlavní funkcí axonu je obousměrný trvalý transport organel, metabolických a strukturálních molekul od těla nervové buňky k jejímu zakončení a zpět. Axony jsou zranitelné vzhledem ke své délce a tvaru a vysokému stupni metabolické aktivity. Na axonálním poranění se může podílet více pochodů (Zhu a kol. 1999; Alcazar a kol. 2000). Jen prostá demyelinizace může sama o sobě vyvolat lokální změny v cytoskeletální síti axonů, a to dokonce v počátku bez zánětlivé infiltrace (Zhu a kol. 1999). Dlouhodobá demyelinizace může vést nepřímo k axonálnímu poškození v důsledku redistribuce sodíkových kanálů nebo chybění oligodendrocytárních enzymů a myelinových proteinů. Axonální

postižení může být způsobeno přímým působením cytotoxických T lymfocytů CD8, mikroglíí a makrofágy, defekty v kalciové homeostáze a excitotoxickými mechanismy, zejména vlivem glutamátu. Axony jsou napadány prozánětlivými cytokiny, oxidativními produkty, volnými radikály a proteolytickými enzymy, které jsou produkovány imunokompetentními a gliálními buněčnými elementy (Rieckmann a Mäurer 2002; Lassmann 2003; Piřha a Havrdová 2005; Brück a Stadelmann 2005).

Není jasné, zda axonální lokální zduřeniny na obou koncích proximálního a distálního axonálního pahýlu vznikají až po přetržení, nebo zdajejich růst předchází ztrátě axonální continuity. U RS je převažujícím názorem, že axony jsou přerušeny zánětlivými pochody a konce oddělených částí axonu teprve potom zduří (Ferguson a kol. 1997; Trapp a kol. 1998). Je však málo přímých důkazů pro přímé přerušování axonu a zduřeniny se našly na axonech u RS i u experimentální autoimunitní encefalomyelitidy. To by mohlo znamenat odlišné pořadí dějů, při kterých axonální zduření předchází Wallerovu degeneraci distálních axonů. Nikoli jediná, ale více zduřenin v tandemu podél axonu se vyskytuje u mnoha chorob CNS – roztroušená skleróza, úraz mozku, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Creutzfeldt-Jakobova nemoc a HIV demence. Lokalizovaná porucha axonálního transportu, zvl. v oblasti Ranvierových zářezů, způsobuje excesivní hromadění axoplazmy, vč. rychle transportovaných bílkovin jako je amyloidový prekurzorový protein (APP). Selhání axonálního transportu s akumulací APP před rupturou axolemy může být tedy časným rysem (Coleman 2005). Kromě špatného anterográdního transportu axonem patří mezi další hlavní mechanismy axonální degenerace také mitochondriální dysfunkce (Dutta a kol. 2006) a zvýšení koncentrace vápníku v axonu, čímž se pravděpodobně spouští závěrečná fáze cytoskeletální degradace aktivovanými kalpainy (Coleman 2005).

8 Neurofilamenta a protilátky proti neurofilamentům

Pro diagnostické nebo léčebné účely se běžně využívá monitorování složek specifických pro určitou tkáň, které se uvolňují do biologických tekutin. Mozek vytváří řadu bílkovin, které jsou selektivně syntetizovány v různých subpopulacích buněk mozku. Doposud je dostupno pouze málo rutinních testů v klinické praxi, které by odrážely patologické děje nervového systému (neuron specifická enoláza, protein S100B, protein 14-3-3, beta-trace protein aj.). Jejich problémem je určitá nespecificita vyplývající např. i z možné produkce mimo nervovou tkáň.

Nároky na biologický ukazatel obecně jsou kladeny vysoké: spolehlivý, reprodukovatelný, neinvazivní, jednoduše proveditelný a levný. V ideálním případě by měl takový ukazatel odrážet základní patogenetické děje a neuropatologické nálezy a jeho výtěžnost by měla být ověřena na neuropatologicky ověřených případech pacientů (Working group 1998; Bielekova a Martin 2004). Jistě bude takové parametry splňovat málokterý.

Dosavadní snahy se soustředily především na zánětlivé parametry u RS. Hledání nových ukazatelů je založeno na základních složkách neuronu, které se uvolňují během a po axonálním poranění. Při poškození se hromadí APP na proximální straně přetržení následkem pokračujícího anterográdního axonálního transportu. Přerušené axony nezastavují axonální anterográdní transport strukturálních a metabolických molekul, které jsou uvolňovány do extracelulárního prostředí. Po přerušení axonu podléhá distální segment Wallerově degeneraci, zatímco proximální část může zaniknout v důsledku chybějících spojení s dalšími neurony. To může vést k degeneraci neuronů a axonů v místech daleko vzdálených od primárního poškození. Při poškození nebo rozpadu nervových buněk se mohou buněčné části uvolňovat do extracelulárního prostoru a posléze do mozkomíšního moku, event.

krve. O tomto procesu svědčí přítomnost bílkovin specifických pro nervovou tkáň v tělních tekutinách. Takovými ukazateli mohou být cytoskeletální proteiny, které se vyskytují v neuronech v hojném množství. Jejich přítomnost může tedy odrážet axonální nebo obecněji nervové poškození. Tyto ukazatele mohou přispívat k diagnostice neurologických onemocnění, předpovídání průběhu, lze podle nich usuzovat na rozsah poškození nebo je využívat při vývoji a hodnocení nových léčebných postupů. Přitom kvantifikace axonálního poškození in vivo u pacientů je klíčovým nástrojem pro monitorování a chápání axonální patologie u různých neurologických onemocnění. Mezi slibné kandidáty v tomto ohledu patří APP a cytoskeletální proteiny (neurofilamenta, tubulin, tau protein a jiné proteiny asociované s mikrotubuly, aktin), které mohou být měřeny v mozkomíšním moku a krvi. Jejich význam bude především jako biochemický ukazatel axonální patologie, i když nelze vyloučit ani jejich diagnostický potenciál při rozlišování různých klinických kategorií. Zajímavé informace by mohlo přinést stanovení více těchto parametrů současně. Tak by mohl být získán proteinový profil neuronálního zániku, ve kterém by některé hladiny byly normální a jiné zvýšené. To by mohlo dále zlepšit diferenciální potenciál těchto ukazatelů. Samozřejmou předností by byla detekce těchto nervově specifických proteinů v krvi. Závisí to na vývoji velice citlivých metod, kterými bude možné specificky detekovat několikanásobně nižší koncentrace zajímavých molekul. Rovněž je třeba počítat s další proměnnou – faktorem přestupu těchto ukazatelů nervového postižení z mozkomíšního moku nebo mozku skrze hematoencefalickou bariéru do krve.

Přestože axonální proteiny jsou skryté uvnitř nervového vlákna, tvorbu protilátek proti cytoskeletu to nevylučuje. Jednak může cytoskelet destrukcí nervové tkáně vstoupit v interakci s dysregulovaným imunitním systémem (fenomén tzv. rozšiřování epitopů) a jednak jsou známy paraneoplastické syndromy, při kterých se protilátky dokáží vázat na cytoplazmatické nebo jaderné

struktury neuronů (Štourač 2005; Bartoš a kol. 2002). Navíc se může uplatňovat fenomén molekulárních mimikrů (Wekerle a Hohfeld 2003).

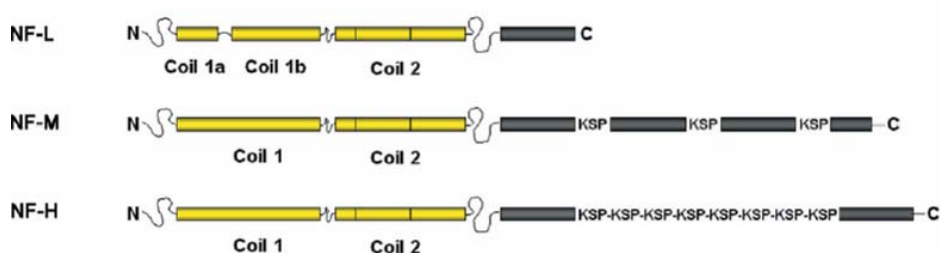
8.1 Neurofilamenta

Hlavní bílkovinou axonálního cytoskeletu jsou neurofilamenta (NF). Neurofilamenta jsou heteropolymery, které se skládají ze 3 podjednotek lišících se molekulovou hmotností (obr. 8.1). **Lehká** neurofilamentová podjednotka (NFL) obsahuje 543 aminokyselin. Molekulová hmotnost odpovídá 61 kDa, ale díky fosforylaci a glykosylaci je migrace v polyakrylamidovém gelu (PAGE) se sodným dodecylsulfátem (SDS) pomalá a většina autorů uvádí molekulovou hmotnost 68 kDa podle detekce v SDS-PAGE. **Středně těžká** neurofilamentová podjednotka (NFM) se skládá z 916 aminokyselin. Molekulová hmotnost je vypočítána na 103 kDa a v SDS gelu odpovídá 150 kDa. **Těžký** neurofilamentový řetězec (NFH) o 1020 aminokyselinách má molekulovou hmotnost 111 kDa. Většina autorů však udává molekulovou hmotnost odvozenou od detekce v SDS gelu, která je ovlivněna nábojem a hmotností, a proto se pohybuje v rozmezí 190-210 kDa podle různé míry fosforylace (Petzold 2005).

Každá NF podjednotka se skládá z vysoce konzervativní alfa-helikální centrální části o asi 310 aminokyselinách. Na jednu stranu pokračuje „hlavičkou“ (N-konec) a na druhé straně je hypervariabilní koncová „ocasová“ doména (C-konec) (obr. 8.1). Je známo, že NFL mohou polymerizovat sama o sobě, zatímco NFM či NFH nikoli. NFL tvoří páteř, ke které se připojují středně těžké (NFM) a těžké řetězce (NFH) (obr. 6.2). Koncové části NFM a NFH tvoří postranní ramena, kterými se spojují s přiléhajícími neurofilamenty a mikrotubuly (Petzold 2005). Funkce NF je

regulována fosforylací a defosforylací, které ovlivňují axonální transport, dynamiku a proteolýzu. NF jsou dopravena z těla nervové buňky do výběžku, kde jsou silně fosforylována. Hlavní fosforylační místa na NFH a NFM jsou lokalizována na C-koncové doméně, která obsahuje mnoho opakování sekvence Lys-Ser-Pro (KSP). Fosforylace na hlavovém konci NFL hraje důležitou roli v dynamice NF. Těžká NF jsou nejvíce fosforylovanými bílkovinami lidského mozku a možná i v celém lidském organismu. Asi 80 % neurofilament je silně fosforylovaných a integrovaných do axoskeletonu. Tvoří tzv. statickou složku. Fosforylace mění náboj na postranních řetězcích. Proto se zdá pravděpodobné, že jednou z funkcí fosforylace je zvýšení odpudivosti sousedících NF. Tak se zvyšuje prostor mezi filamenty a zvětšuje se průměr axonu (Fuchs a Cleveland 1998). Axonální průměr a rychlost vedení jsou vzájemně spjaty. Zbývajících 20 % NF se jako tzv. dynamická složka účastní antero- a retrográdního axonálního transportu (Nixon 1993; Al-Chalabi a Miller 2003; Lariviere a Julien 2003; Petzold 2005). NF jsou degradována proteázami v nervových zakončeních.

Obr. 8.1 Schéma tří podjednotek neurofilamentového tripletu (NF-L lehká, NF-M středně těžká, NF-H těžká podjednotka) (převzato z Lariviere a Julien 2003)



8.2 Neurofilamenta u roztroušené sklerózy

Zvýšená imunoreaktivita nefosforylovaných NF byla detekována v aktivních lézích RS (Trapp a kol. 1998). Po axonálním poškození jsou NF degradována kalpainem, takže do MMM se mohou uvolňovat neurofilamentové peptidy (Banik a kol. 1997). Podle složité proteomické analýzy patří mezi několik málo antigenů odlišujících séra pacientů s RS od ostatních subjektů i NFL (Almers a kol. 2004).

U pacientů s roztroušenou sklerózou byly opakovaně nalezeny zvýšené koncentrace NF v MMM (Lycke a kol. 1996; Semra a kol. 2002; Eikelenboom a kol. 2003; Malmeström a kol. 2003; Norgren a kol. 2004; Petzold a kol. 2005). NFL v MMM jsou zvýšená u všech typů RS podle průběhu a zvláště po atace RS do 2-3 měsíců (Lycke a kol. 1998; Semra a kol. 2002; Malmeström a kol. 2003; Norgren a kol. 2004). Nejvyšší hodnoty se objevily přibližně 3 týdny po začátku relapsu (Malmeström a kol. 2003). Detekce vysokých hladin neurofilament v MMM pacientů s relaps-remitujícím průběhem RS odpovídá histopatologickým důkazům časného axonálního poškození u RS (Trapp a kol. 1998; Bjartmar a kol. 2001). Koncentrace NFL nezávisí na věku, pohlaví a trvání choroby (Lycke a kol. 1998; Semra a kol. 2002; Malmeström a kol. 2003). Mezi hladinou NFL a mírou invalidizace určené pomocí hodnoty EDSS nebyl nalezen konzistentní vztah. Některé studie vazbu prokázaly (Lycke a kol. 1998; Semra a kol. 2002), jiné nikoli (Malmeström a kol. 2003). Vysoká hladina NFL korelovala s progresí u pacientů s RS (Norgren a kol. 2004). Zvýšení NFH v MMM během 3letého sledování bylo významnější u pacientů s chronickou primární nebo sekundární progresí RS než u pacientů v relaps-remitující fázi (Petzold a kol. 2005). Vysoké hladiny NFL nebo NFH v MMM by tedy mohly být nepříznivým prognostickým znamením u RS.

8.3 Neurofilamenta u ostatních neurologických onemocnění

Hladiny fosforylovaných NFM a NFH byly významně zvýšeny v mozcích pacientů s Alzheimerovou demencí (AD) (Wang a kol. 2001). Při detekci hladiny a fosforylačního stavu NF podjednotek v MMM od pacientů s AD pomocí ELISA testů byla nalezena následující zjištění. Hladiny NFL a fosforylovaných (12-24x) a nefosforylovaných (3-4x) NFM a NFH byly významně vyšší u neurologicky zdravých seniorů než u mladých kontrolních jedinců. Hladiny NFL a nefosforylovaných NFM a NFH u AD byly podobné jako u vaskulární demence a vyšší než u věkově srovnatelných kontrol. Hladiny fosforylovaných NFM a NFH byly u AD významně vyšší než u stejně starých kontrol, pacientů s jinými chorobami než AD a osob s vaskulární demencí. Zvýšené hodnoty celkových NF proteinů v mozkomíšním moku mohou být použity proto jako ukazatele stárnutí mozku a neurodegenerativních chorob obecně. Hladiny fosforylovaných NFM a NFH mohou sloužit jako ukazatel rozlišující AD od normálního stárnutí mozku a jiných neurologických stavů včetně vaskulární demence (Hu a kol. 2002).

Zvýšené hladiny NFL v MMM jsou také u jiných neurodegenerativních chorob typu amyotrofické laterální sklerózy a demencí (Rosengren a kol. 1996; Rosengren a kol. 1999), encefalitid (Studahl a kol. 2000) a mozkové vaskulitidy (Nylen a kol. 2002).

8.4 Protilátky proti neurofilamentům u RS

Po axonálním poranění se mohou uvolnit neurofilamenta do intersticiálního prostředí a jako antigeny vyvolat imunitní reakci spojenou s tvorbou protilátek. Doposud byly publikovány pouze 4 práce na téma protilátek proti neurofilamentům u RS.

Protilátky ve třídě IgA, IgM a IgG proti směsi lehkých, středních a těžkých neurofilament byly u pacientů s RS zvýšené oproti pacientům s iktu nebo zdravým osobám (Hughes a kol. 2001). Intratekální produkce anti-NFL protilátek byla významně zvýšená u pacientů s RS s primárně nebo sekundárně progresivním průběhem. Protilátky proti NFH byly podobné u pacientů s RS jako u kontrolních jedinců. Protilátky proti NFL a NFH souvisely s trváním choroby a mírou invalidity, vyjádřené EDSS (Silber a kol. 2002). Intratekální produkce protilátek proti NFL pacientů s RS korelovala s atrofickými změnami na MR mozku (Eikelenboom a kol. 2003). Sérové IgG protilátky proti NFL byly významně zvýšené u pacientů s primárně progresivním průběhem RS (Ehling a kol. 2004).

8.5 Protilátky proti neurofilamentům u ostatních onemocnění

Protilátky proti NF byly detekovány u různých chorob jako např. u Alzheimerovy choroby, Guillain-Barré syndromu, amyotrofické laterální sklerózy, systémového lupus erythematosus, syndromu opsoklonu-myoklonu, spongiformní encefalopatie a u iktu (Bahmanyar a kol. 1983; Stefansson a kol. 1985; Karcher a kol. 1986; Noetzel a kol. 1987; Robbins a kol. 1988; Chapman a kol. 1989; Couratier a kol. 1998; Terryberry a kol. 1998; Bornstein a kol. 2001). Sérové protilátky IgG proti NFL byly významně vyšší u pacientů s glaukomem než u zdravých kontrol a pacientů s jinými chorobami duhovky nebo zřetkového nervu (Yano a kol. 2005).

9 Východiska výzkumné práce

Roztroušená skleróza je velmi variabilní onemocnění z hlediska klinických, radiologických a mozkomíšních nálezů. Průběh může být relaps-remitující nebo progresivní a prognóza u jednotlivce s RS je nejasná. Odlišné patogenetické mechanismy se mohou vyskytovat u různých podskupin pacientů s RS. Imunopatogenetická heterogenita se vyhraňuje na čtyři základní vzorce, z nichž jeden je autoimunitní demyelinizace zprostředkovaná protilátkami (tzv. vzorec II) (Lucchinetti a kol. 2000). Vzorec histopatologických změn se může promítat do sérových nebo mozkomíšních abnormalit a může být sdružen s klinickým průběhem podskupiny pacientů s RS a s odlišnou odpovědí na zvolenou léčbu (Keegan a kol. 2005).

Během akutního zánětu se trhá mnoho axonů. Konce přetržených axonů mohou být znázorněny protilátkami proti neurofilamentům nebo amyloidovému prekurzorovému proteinu (Ferguson a kol. 1997; Trapp a kol. 1998). Po přerušení podléhá distální část Wallerově degeneraci a proximální segment a tělo nervové buňky může zaniknout vlivem ztráty kontaktů s dalšími neurony. Postižení tkáně se může týkat i zón šedé hmoty mozkové, zejména mozkové kůry, která je v kontaktu s mozkomíšním mokem. Korové léze byly podhodnocovány, protože jsou méně nápadné makroskopicky, histologicky a na konvečních T2-vážených obrazech MR. Korové léze jsou provázeny nervovým poškozením vč. otoku neuritů a dendritického a axonálního přetržení. Obvykle nejsou sdruženy se zvýšenou lymfocytární infiltrací a převažuje mikroglialní aktivace (Brück a Stadelmann 2005; Bjartmar a kol. 2003).

Není jasné, zda protilátky proti nervovým strukturám se podílejí na poškození nebo jsou epifenomémem axonálního poškození. V obou případech jsou anti-NF protilátky spojeny s desintegrací axocytoskeletálních proteinů. Nálezy v MMM nebo séru

odrážející tyto procesy mohou vymezit podskupinu pacientů s převažujícími mechanismy protilátkové autoimunity (tzv. histopatologický vzorec II) bez biopsie a zvolit vhodnou účinnou léčbu, např. plazmaferézu (Keegan a kol. 2005).

10 Hypotézy a motivy výzkumu

Axonální poškození u roztroušené sklerózy postihuje difúzně mozek a míchu již od časných stadií onemocnění. V rámci autoimunitní povahy onemocnění se mohou vytvářet protilátky proti strukturám specifických pro axon. Typickou cytoskeletální bílkovinou pro neuron jsou neurofilamenta, která se vytvářejí ze tří podjednotek: lehké, střední a těžké. Protilátky proti neurofilamentům se mohou podílet na rozvoji poranění axonu, což zatím experimentálně nebylo prokázáno. Axonální přerušování a následná Wallerova degenerace distální části vede k uvolnění neurofilament. Autoimunitní útok namířený proti těmto jinak skrytým antigenům může být provázen tvorbou protilátek jako epifenomén autodestrukčních procesů. Anti-neurofilamentové (anti-NF) protilátky v séru a mozkomíšním moku u pacientů s RS bez ohledu na jejich primární nebo sekundární roli tak obecně mohou odrážet axonální patologii. Protože se neukázal rozdíl v intratekální syntéze protilátek proti těžké podjednotce neurofilamentového tripletu (Silber a kol. 2002), mé studium bylo zaměřeno na ověření výpovědní hodnoty protilátek proti lehké a středně těžké podjednotce. Protilátky byly stanovovány v séru a paralelně v mozkomíšním moku v obou základních imunoglobuliných (Ig) třídách IgM a IgG.

Výzkum byl motivován těmito hypotézami a otázkami:

1. Intratekální syntéza anti-NF protilátek u pacientů s roztroušenou sklerózou je vyšší než u kontrolních osob.
2. Anti-NF odpověď u pacientů s progresivním průběhem, ať už primárním nebo sekundárním, je vyšší než u pacientů v relabující-remitující fázi RS.

3. Hladina anti-NF protilátek u pacientů v atace je vyšší než v remisi.
4. Pacienti s krátkým trváním RS (tj. v časném stadiu) mají menší anti-NF reakci než pacienti s dlouhodobým onemocněním.
5. Pacienti s krátkým trváním mají převažující IgM anti-NF odpověď, zatímco po delší době RS dominují IgG anti-NF protilátky.
6. Pacienti s větší hladinou intratekálních anti-NF protilátek jsou více invalidizováni a mají rychlejší progresi RS.
7. Mění se intratekální syntéza anti-NF protilátek s věkem?
8. Jak vysoká je hladina anti-NF protilátek v séru a v mozkomíšním moku?
9. Jak silná je vazba mezi produkcí anti-NF protilátek v séru a mozkomíšním moku?
10. Jak ovlivňuje imunosupresivní a imunomodulační léčba úroveň anti-NF reakce?
11. Mění se hladina anti-NF protilátek v průběhu RS u téhož nemocného?
12. Souvisí intratekální syntéza anti-NF protilátek IgG s intratekální syntézou celkových IgG?

11 Pacienti a metodika

11.1 Pacienti a kontrolní osoby

Ke stanovení protilátek proti **lehké podjednotce** neurofilamentového tripletu byly získány párové vzorky MMM a séra od 58 pacientů s RS a 104 kontrolních subjektů, kteří podstoupili lumbální punkci v rámci rutinního diagnostického vyšetřování nebo z indikace intratekální aplikace imunosupresiv (tab. 12.1, 12.2). Diagnóza klinicky jisté roztroušené sklerózy a typ průběhu RS v době lumbální punkce byly určeny podle platných kritérií (Poser a kol. 1983; Lublin a kol. 1996). Analýza výsledků MR mozku nebyla součástí projektu, protože MR vyšetřování probíhalo na různých pracovištích s různými přístroji a sekvencemi. Z téhož důvodu a s ohledem na fakt, že sběr vzorků začal v roce 2000, nebyla použita nová mezinárodní kritéria pro diagnózu RS (McDonald a kol. 2001). Osm pacientů s jedinou neurologickou příhodou odpovídající lézi v CNS (tzv. klinicky izolovaný syndrom) splnilo nová kritéria pro časnou diagnostiku roztroušené sklerózy (McDonald a kol. 2001). Pět z nich dostalo druhou ataku potvrzující klinicky jistou roztroušenou sklerózu (Poser a kol. 1983) při sledování jejich dalšího průběhu v rozmezí od jednoho do tří let. Pacienti s roztroušenou sklerózou byli rozděleni do následujících kategorií: klinicky izolovaný syndrom (CIS), relaps-remitující (RR) forma, buď v době ataky (22 pacientů) nebo během remise (15 pacientů), sekundárně progresivní (SP) forma a primárně progresivní (PP) forma. Šestnáct pacientů s RS nebylo před provedením lumbální punkce vůbec léčeno, dvacet pět užívalo imunosupresivní léčbu (steroidy a/nebo azatioprin) a sedmnáct pacientů bylo léčeno imunodulačními preparáty (interferony beta nebo glatiramer acetát) a zároveň imunosupresivní léčbou. V zájmu zachování konzistence údajů určoval míru invalidity pomocí tzv. the Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke a kol. 1983) téměř u všech pacientů

s RS jeden vyšetřující (doktorand). Kumulativní tíže postižení byla hodnocena pomocí tzv. Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS), který je kombinovaným vyjádřením míry invalidizace (EDSS) a trvání choroby (Roxburgh a kol. 2005). MSSS bylo vyvinuto ke kompenzaci nelinearity EDSS a za účelem určení rychlosti progresu u pacientů s RS, když určitý pacient má jediné vyšetření. EDSS a proto MSSS nebylo k dispozici u 7 z 58 pacientů s RS. U 11 pacientů byla k dispozici opakovaná vyšetření párových vzorků MMM a séra v rozmezí od 7 do 313 dnů.

Ke studiu protilátek proti **středně těžké podjednotce** neurofilamentového tripletu byly analyzovány párové vzorky MMM a séra od 49 pacientů s RS a 51 kontrolních subjektů (tab. 12.3, 12.4). Klasifikace, míra invalidizace a rychlost progresu byly stanoveny na podobném principu jako v projektu protilátek proti lehké podjednotce neurofilament. Devět pacientů s RR formou mělo v době odběru MMM a séra ataku a dvacet pacientů s RR bylo v remisi. Šestnáct pacientů s RS nemělo léčbu před lumbální punkcí, dvacet pacientů užívalo imunosupresiva (steroidy nebo azatioprin nebo obojí), třináct pacientů s RS mělo kombinovanou imunodulační (interferony nebo glatiramer acetát) a imunosupresivní léčbu. Mozkomíšni mok a sérum sedmi pacientů byly vyšetřeny 2x a u dvou pacientů dokonce 3x v intervalu od 7 dnů do 3 měsíců.

Kontrolní jedinci byli rozděleni do tří skupin. Normální osoby (CN) se manifestovaly vertigem nebo bolestí hlavy (vertebrogenní, nespecifickou, migrenózní) nebo psychogenními či únavovými syndromy. Vyšetření a podrobné zhodnocení pacientů nepřineslo konkrétní vysvětlení pro jejich potíže. Pacienti s různými onemocněními (např. polyneuropatie, meningitida, encefalitida, Bellova faciální obrna aj.) tvořili další skupinu dále označovanou CD. Většina pacientů v poslední kontrolní skupině s neurodegenerativními chorobami (CDEG) měla amyotrofickou laterální sklerózu, zbývající Alzheimerovu chorobu, Huntingtonovu chorobu a další neurodegenerativní onemocnění.

Pacienti nebo jejich odpovědní zástupci podepsali informovaný souhlas s účastí ve studii. Etická komise 3. LF UK neměla námitek proti realizaci a studii schválila. Vzorky byly skladovány do doby biochemické analýzy v mrazících boxech na -20° C. Biochemikům stanovujícím anti-NF protilátky nebyly známy diagnózy pacientů.

11.2 Stanovení základních proteinů a výpočty

Koncentrace albuminu a celkových IgG v MMM a séru byly měřeny imunonefelometricky (Immunotech Beckman for IMAGE 4). Funkce hematolivorové bariéry byla hodnocena podle albuminového kvocientu (albumin v MMM/albumin v séru) (Tibbling a kol. 1977). Hodnoty $> 7 \cdot 10^{-3}$ ukazují na porušenou bariéru. IgG index byl vypočítán podle vzorce:

$$\frac{(\text{IgG v MMM/IgG v séru})}{\text{-----}} \\ (\text{albumin v MMM/albumin v séru})$$

, aby se zohlednil případný pasivní přestup IgG přes porušenou hemato-likvorovou bariéru (Link a kol. 1977). Obvyklá hranice mezi normální a zvýšenou hodnotou odpovídající intratekální syntéze IgG v moku je 0.65. K posouzení intratekální syntézy anti-NF protilátek v obou třídách IgM a IgG byl vypočítán tzv. anti-NF index stejným způsobem:

$$\frac{(\text{anti-NF IgM či IgG v MMM/anti-NF IgM či IgG v séru})}{\text{-----}} \\ (\text{albumin v MMM/albumin v séru}).$$

11.3 Stanovení protilátek proti neurofilamentům

Protilátky proti lehké a středně těžké podjednotce neurofilamentového tripletu byly změřeny imunotestem na pevné fázi sdružené s enzymem (ELISA) podle Silbera a kol. (Silber a kol. 2002) na Imunochemickém oddělení, Ústav lékařské biochemie a Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, UK 1. LF, Praha kolektivem lékařů: MUDr. Lenka Fialová, CSc., MUDr. Jiřina Soukupová, Doc. MUDr. Ivan Malbohan, CSc. Jako antigen byla použita lehká (68 kDa) a středně těžká podjednotka (160 kDa) neurofilament (Progen, Heidelberg, Německo), které byly izolovány z hovězí míchy do čistoty alespoň 98 % podle informace producenta. Protože neurofilamenta jsou vysoce konzervativní proteiny mezi živočišnými druhy, existuje vysoká homologie mezi lidskými a hovězími neurofilamenty (Yano a kol. 2005). Séra od každého pacienta byla ředěna 1:400 ve fosfátové soli s 1% hovězím sérovým albuminem (BSA v PBS) a MMM byl použit neředěný. Neurofilamenta byla rozpuštěna v bikarbonátovém pufru. Jednotlivé 96-jamkové mikrodestičky (Maxisorp, NUNC, Dynatech, Dánsko) byly povlečeny neurofilamenty v roztoku a inkubovány přes noc ve 4 °C. Po blokování 10% hovězím sérem v PBS jednu hodinu v pokojové teplotě bylo přidáno ředěné sérum a neředěný MMM do jamek ve dvojicích a inkubovány dvě hodiny při teplotě 37 °C. Destičky byly poté vypláchnuty a inkubovány 90 minut při 37 °C s kozí protilátkou konjugovanou s křenuvou peroxidázou a namířenou proti lidskému IgG nebo IgM (Sevapharma, Česká republika). Po vymytí destiček byl přidán substrát (3,3',5,5' - tetramethylbenzidin) a H₂O₂ (TEST-LINE, Česká republika) na dobu 30 minut ve tmě za pokojové teploty. Enzymatická reakce byla zastavena přidáním 2 mol/l H₂SO₄. Absorbance každé jamky byla zjištěna při dvou vlnových délkách (450 nm a 620 nm) na ELISA čtečce (Labsystems, Helsinky, Finsko). Od absorbance testovaných vzorků bylo odečteno průměrné pozadí jamky obsahující pouze 1% hovězí albumin.

Mozkomíšní mok a odpovídající sérum každého pacienta byly analyzovány vždy na té samé destičce.

Protilátky proti neurofilamentům nebyly dosud standardizovány. Proto se využívala směs sér z několika pacientů jako standard při všech stanoveních anti-NF protilátek u pacientů a kontrol. Směsné sérum se sériovým ředěním bylo přidáno na každou destičku. Výsledky získané z absorbancí tohoto standardu byly použity pro vytvoření kalibrační křivky. Nejvyšší měřitelné anti-NF hladině standardního séra byla přisouzena hodnota 100 arbitrárních jednotek. Arbitrární jednotky pro vzorky MMM a séra jednotlivých pacientů byly zjištěny ze standardní křivky (u séra pak ještě vynásobením ředícím faktorem 400). V případě vyšší koncentrace než nejvyšší standard byla analýza opakována ve vhodně nařazených vzorcích. Ke zhodnocení vlivu opakovaného rozmrazení a zmrazení vzorků bylo vyšetřeno znovu šest vzorků MMM a séra po prvním a druhém rozmrazení. Pomocí Studentova t-testu nebyla shledána změna v hladině anti-NF protilátek v MMM nebo séru po prvním a po druhém rozmrazení.

11.4 Statistika

Nejdříve byla zjištěna distribuce dat a vzhledem k nenormálnímu rozložení byly použity neparametrické testy. Rozdíly mezi skupinami byly posuzovány Wilcoxonovým testem. Vztahy mezi proměnnými byly vyhodnocovány Spearmanovým korelačním koeficientem. Hladina významnosti byla pro všechny testy nastavena na 0.05. Analýzy byly provedeny v prostředí Matlabu ve spolupráci s Doc. Ing. Jaromírem Kukalem, PhD z VŠCHT.

12 Výsledky

12.1 Protilátky proti lehké podjednotce neurofilamentového tripletu

Klinické rysy a výsledky v mozkomíšním moku a séru jsou shrnuty pro pacienty s RS v tab. 12.1 a pro tři kontrolní skupiny v tab. 12.2. Věk subjektů v době lumbální punkce se statisticky nelišil pro skupinu pacientů s RS, skupinu CN a skupinu CD. Věk v době lumbální punkce, EDSS a MSSS byly významně nižší ve skupině pacientů s RR průběhem RS než u pacientů s progresivní fází choroby.

Tab. 12.1

Klinické a laboratorní nálezy u pacientů s roztroušenou sklerózou

Skupina	Všichni RS*	RR-RS	SP-RS	PP-RS
Počet pacientů	58	37	15	6
Ženské pohlaví (%)	71	68	73	83
Věk v době LP (roky)	38 (24-58)	32 (24-56)	50 (30-58)	46 (28-58)
Trvání choroby do doby LP (roky)	5 (0.5-35)	3 (0.5-26)	15 (2.5-35)	3 (0.5-10)
EDSS v době LP	3.5 (0-6.5)	2.0 (0-6.0)	5.0 (1-6.5)	4.5 (3-6)
MSSS v době LP	5.3 (0.2-9.7)	4.6 (0.2-9.7)	5.2 (0.2-8.8)	8.8 (7.5-9.4)
Léčba				
žádná	16	12	1	3
pouze imunosupresivní	25	13	9	3
imunosupresivní a imunomodulační	17	12	5	0
IgG v séru (g/l)	9.2 (5.2-16.6)	9.8 (5.9-16.6)	9.1 (5.8-13.7)	10.5 (5.2-11.7)
IgG v moku (mg/l)	42 (15-143)	43 (17-120)	32 (17-90)	87 (15-143)
Poměr albuminu v séru/v moku ($\cdot 10^{-3}$)	4.9 (1.8-12.1)	5.1 (1.8-12.1)	5.0 (2.5-7.5)	4.6 (3.7-6.0)
IgG index	0.8 (0.4-2.4)	0.8 (0.4-2.1)	0.7 (0.4-2.4)	1.8 (0.7-2.3)
Anti-NFL IgG index	0.60 (0.05-8.5)	0.63 (0.05-8.5)	0.44 (0.14-2.87)	0.82 (0.26-1.26)
Anti-NFL IgM index	0.03 (0-0.25)	0.03 (0-0.22)	0.03 (0-0.25)	0.02 (0-0.14)

Hodnoty jsou uvedeny jako počet nebo medián (rozsah).

RS = roztroušená skleróza; RR = relaps-remitující; SP = sekundárně progresivní; PP = primárně progresivní; LP = lumbální punkce; EDSS = Expanded Disability Status Scale; MSSS = Multiple Sclerosis Severity Score; IgG = immunoglobulin G; imunosupresivní léčba = steroidy nebo azatioprin nebo obojí; imunomodulační léčba = interferony beta nebo glatiramer acetát; IgG index = (IgG v MMM/IgG v séru)/(albumin v MMM/albumin v séru); Anti-NFL IgM či IgG index = (anti-NFL IgM či IgG v MMM/anti-NFL IgM či IgG v séru)/(albumin v MMM/albumin v séru).

* Pacienti s klinicky izolovaným syndromem nebyli zahrnuti do skupiny označené „Všichni RS“.

Tab. 12.2 Klinické a laboratorní nálezy u kontrolních jedinců

Skupina	CN	CD	CDEG
Počet subjektů	24	49	31
Ženské pohlaví (%)	68	52	54
Věk v době LP (roky)	34 (17-54)	45 (19-60)	55 (26-59)
IgG v séru (g/l)	10.4 (6.5-15.7)	11.2 (5.9-16.6)	10.4 (5.5-17.9)
IgG v moku (mg/l)	21.7 (8-76.5)	32.8 (11-134)	29.5 (18-165)
Poměr albuminu v séru/v moku ($\cdot 10^{-3}$)	3.9 (2.1-12.5)	5.9 (1.8-23.6)	5.4 (1.9-15.6)
IgG index	0.5 (0.4-0.7)	0.5 (0.2-0.8)	0.5 (0.4-1.1)
Anti-NFL IgG index	0.37 (0.3-8.00)	0.35 (0.08-3.44)	0.51 (0.18-2.35)
Anti-NFL IgM index	0.01 (0-0.12)	0.03 (0-0.77)	0.06 (0.004-1.29)

Hodnoty jsou uvedeny jako počet nebo medián (rozsah).

LP = lumbální punkce; IgG = immunoglobulin G; CN = normální kontrolní jedinci; CD = kontrolní osoby s neurologickými chorobami; CDEG = kontrolní pacienti s neurodegenerativními chorobami; IgG index = (IgG v MMM/IgG v séru)/(albumin v MMM/albumin v séru); Anti-NFL IgM či IgG index = (anti-NFL IgM či IgG v MMM/anti-NFL IgM či IgG v séru)/(albumin v MMM/albumin v séru).

Zhodnocení protilátek.

Koncentrace celkových IgG v séru byla významně nižší u pacientů s RS při srovnání se skupinou CN ($p = 0.04$) nebo skupinou CD ($p = 0.002$). Celkové imunoglobuliny IgG v séru byly nižší u pacientů s RS užívající jakýkoli typ léčby ve srovnání s neléčeným pacienty s RS ($p = 0.006$) nebo jedinci ve skupině CN ($p = 0.004$). Neléčení pacienti s RS a jedinci v CN měli podobné koncentrace celkového IgG v séru. Celkové IgG v MMM byly vyšší u pacientů s RS než u osob ve skupinách CN nebo CD ($p < 0.04$). Celkové IgG a albumin v MMM byly podobné u pacientů s RS, kteří byli bez léčby, kteří užívali imunosupresivní léčbu nebo kteří měli kombinovanou imunosupresivní a imunomodulační léčbu. IgG index byl významně zvýšen u pacientů s RS při porovnání s jakoukoli kontrolní skupinou ($p < 0.0001$). Neléčení pacienti s RS a pacienti s RS bez ohledu na typ léčby měli podobný IgG index a jakákoli z těchto dvou skupin měla IgG index vyšší než ve skupině CN.

Protilátková *IgM* odpověď proti NFL v séru byla podobná u skupiny pacientů s RS, CN i CD. Hladina anti-NFL *IgG* protilátek v séru pacientů s RS byla významně nižší než ve skupině CD ($p = 0.002$) a podobná jako u skupiny CN. Rozdíly v sérových anti-NFL *IgG* protilátkách mezi RR, SP a PP pacienty s RS nebyly nalezeny (obr. 12.1 A, B). Protilátky *IgM* a *IgG* proti NFL v MMM byly přítomny v podobné míře u skupiny RS a u kontrolních skupin s výjimkou zvýšených hladin *IgM* u pacientů v CDEG při porovnání se skupinou RS ($p = 0.01$) (obr. 12.1 C, D). **Intratekální syntéza *IgM* protilátek proti NFL** ve skupině CDEG byla významně vyšší než ve skupině RS, CN nebo CD ($p < 0.002$). Intratekální produkce *IgG* protilátek proti NFL byla významně zvýšená u pacientů s RS při srovnání se skupinou CD ($p = 0.002$), avšak nikoli se skupinou CN (obr. 12.1 E, F). Při nové analýze po odstranění tří pacientů ze skupiny CN s nejvyššími hodnotami anti-NFL indexů bylo dosaženo statisticky významného rozdílu anti-NFL indexů mezi skupinou RS a

CN. Podobný efekt rozdílu byl shledán i při další analýze, pokud do ní byli zavzati pacienti starší 20 let ve všech skupinách.

Intratekální IgG a IgM syntéza se nelišila mezi podskupinami RS podle průběhu (RR, SP, PP) (obr. 12.1 E, F). Pacienti s RS v atace měli podobné intratekální hladiny anti-NFL IgM a IgG protilátek jako pacienti s RS v remisi. Pacienti s CIS se nelišili od pacientů s RS nebo subjektů v CN z hlediska anti-NFL protilátek v séru (IgG třída), MMM (IgG třída) a intratekální syntézy (IgG nebo IgM třída). Sérové anti-NFL IgM protilátky u pacientů s CIS byly významně nižší než u pacientů s RS ($p = 0.02$) nebo ve skupině CN ($p = 0.02$). Naopak hladiny anti-NFL IgM protilátek byly vyšší u pacientů s CIS než u osob ve skupině CN ($p = 0.04$).

Obr. 12.1 A-F

Hladiny protilátek proti lehké podjednotce neurofilamentového tripletu vyjádřené jako arbitrární jednotky nebo vypočítané jako indexy od jedinců s roztroušenou sklerózou (MS) jako celek, od pacientů s RS v relaps-remitující fázi (RR), v sekundárně progresivním stadiu (SP) a s primární progresí (PP), dále od normálních kontrolních jedinců (CN), od pacientů s různými neurologickými chorobami (CD) a pacientů s neurodegenerativními chorobami (CDEG). Arbitrární jednotky byly odvozeny z kalibrační křivky standardu.

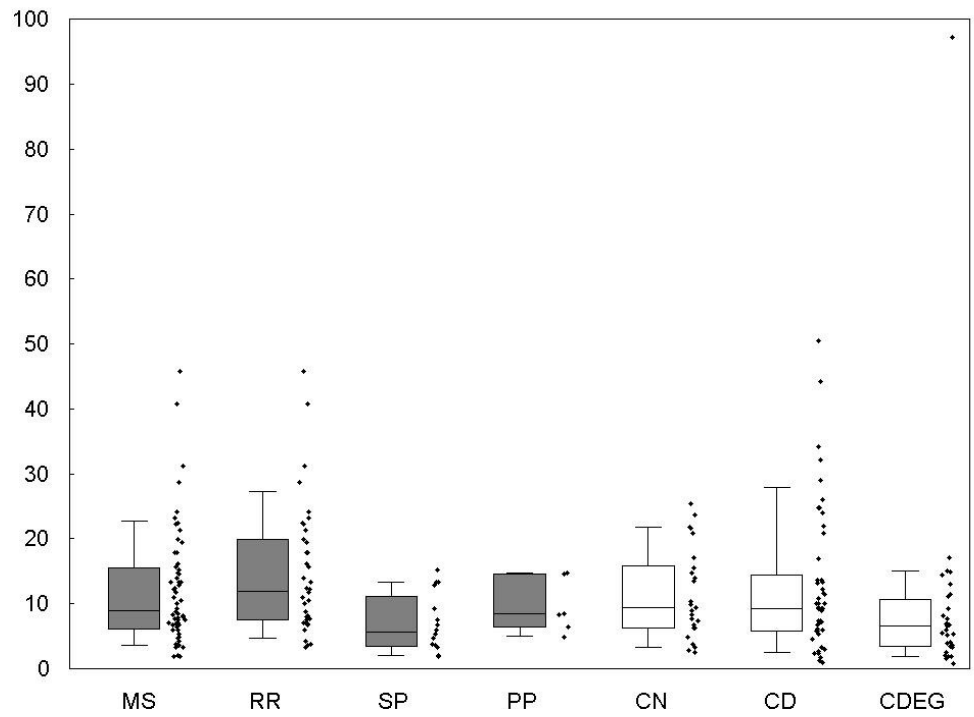
(A, B) Sérové protilátky byly podobné ve všech skupinách s výjimkou nižších hladin IgG proti NFL u pacientů s RS ve srovnání se skupinami CN nebo CD ($p < 0.008$).

(C, D) Protilátky v mozkomíšním moku byly podobné pro RS i kontrolní skupiny s výjimkou zvýšených IgM u pacientů s RS oproti skupině CN ($p = 0.01$).

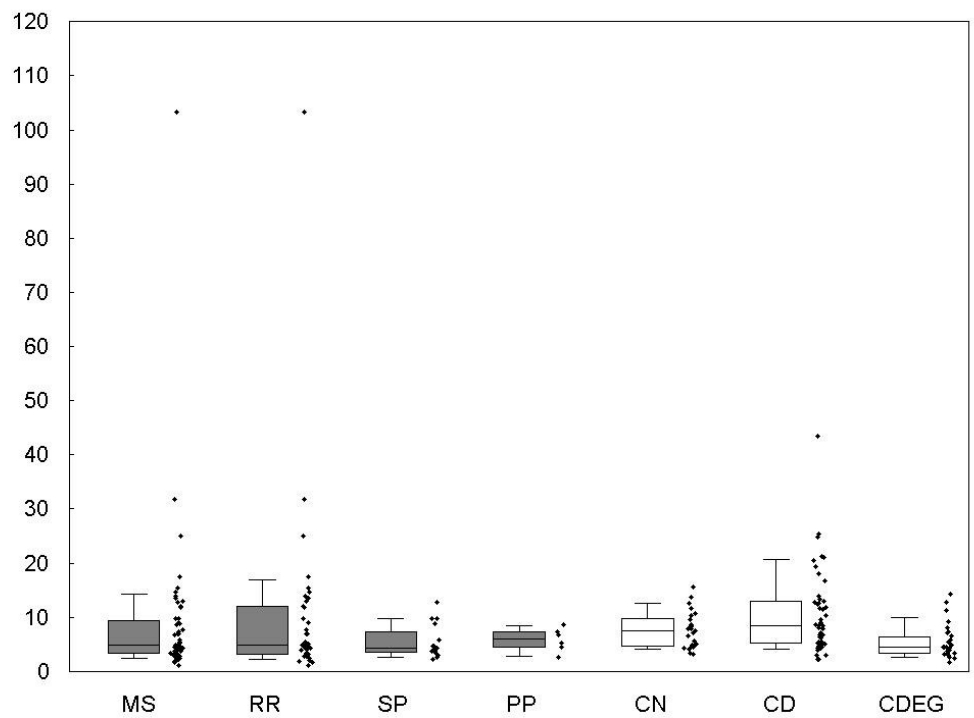
(E, F) Logaritmická stupnice. Intratekální syntéza *IgM* protilátek proti NFL ve skupině CDEG byla významně vyšší než v ostatních skupinách: CN, CD a dokonce i RS. Intratekální produkce *IgG* protilátek proti NFL byla významně zvýšená u pacientů s RS při srovnání se skupinou CD ($p = 0.002$), avšak nikoli se skupinou CN. Lokální IgM a IgG syntéza v kompartmentu CNS byla podobná pro pacienty s RS se všemi typy průběhů (RR, SP, PP).

Box graf znázorňuje medián (horizontální čára —), hodnoty mezi 25. a 75. percentilem (obdélníky □), svislé úsečky nahoru a dolů vedou k 10., resp. 90. percentilu. Sousední bodová prezentace ukazuje jednotlivé hodnoty, z nichž byly odvozeny statistické charakteristiky. Šedé obdélníky patří pacientům s RS, bílé obdélníky vyjadřují výsledky kontrolních jedinců.

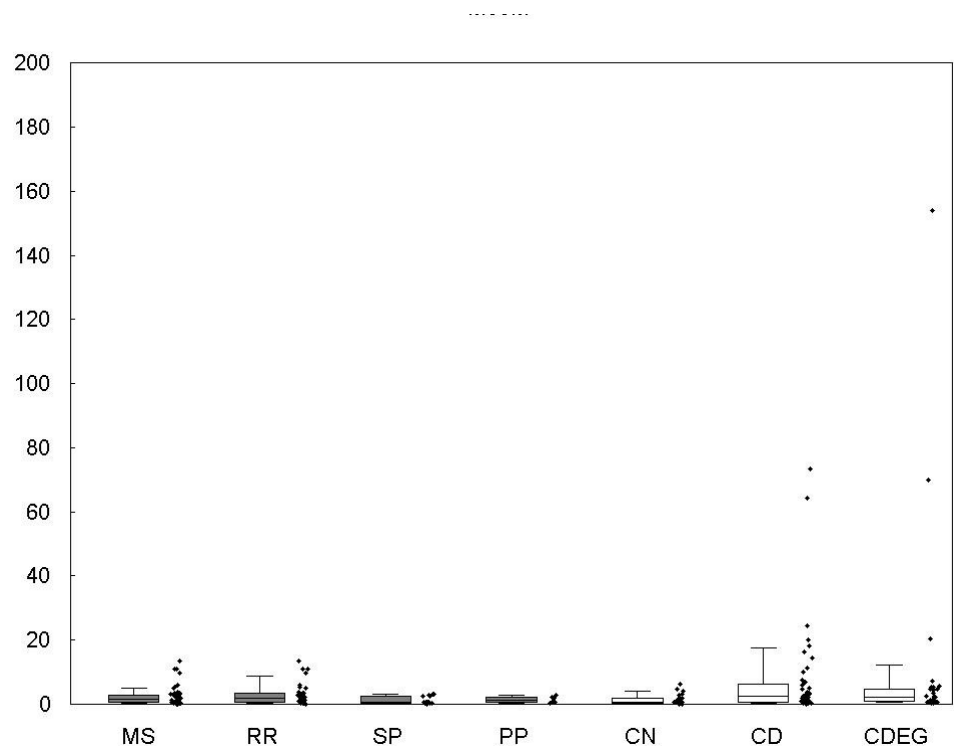
Obr. 12.1 A Sérové anti-NFL IgM (arbitrární jednotky)



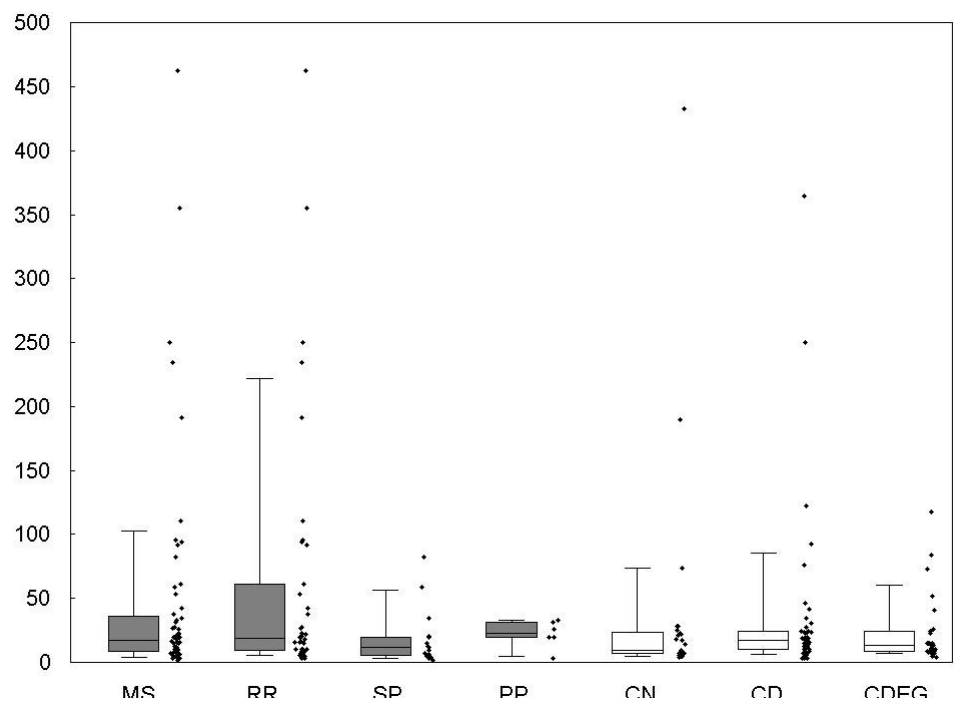
Obr. 12.1 B Sérové anti-NFL IgG (arbitrární jednotky)



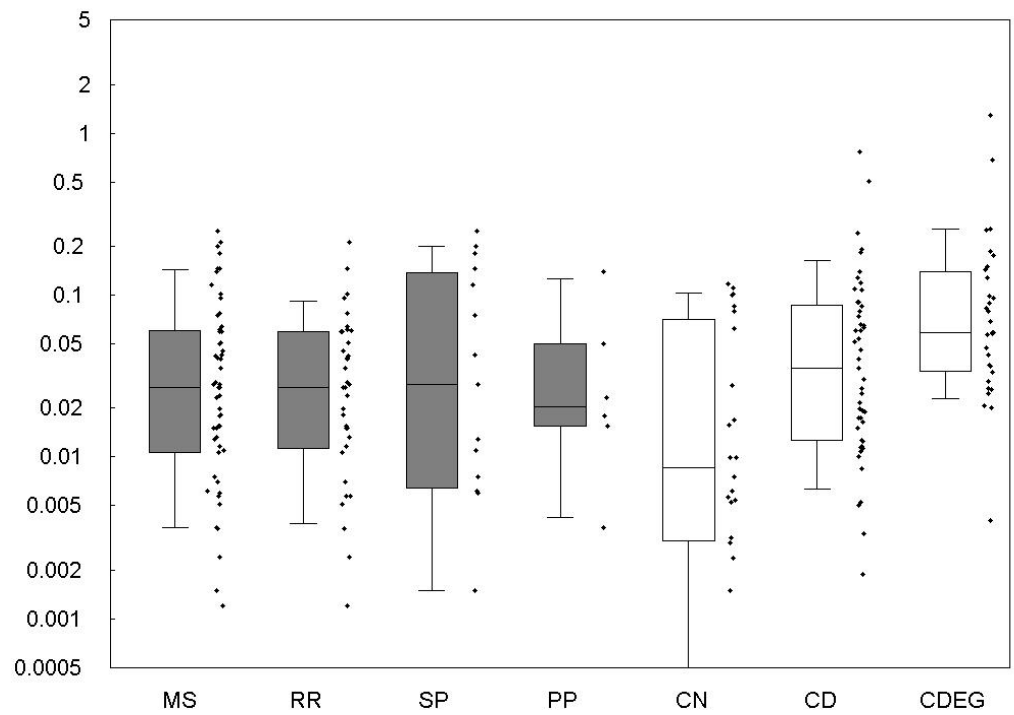
Obr. 12.1 C Mozkomíšní anti-NFL IgM (arbitrární jednotky)



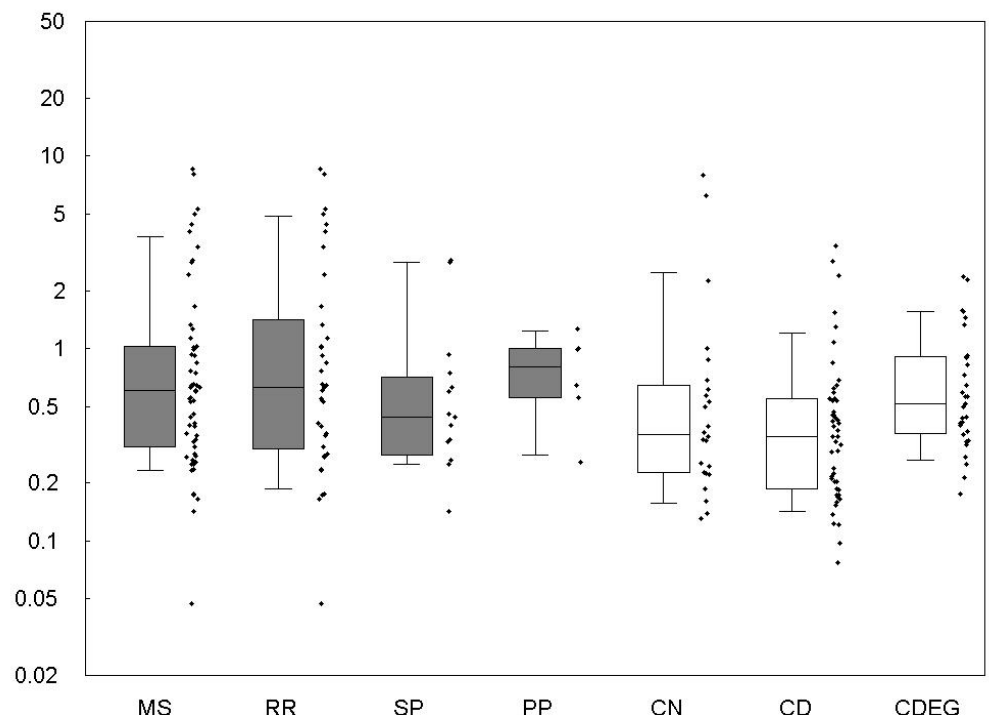
Obr. 12.1 D Mozkomíšní anti-NFL IgG (arbitrární jednotky)



Obr. 12.1 E Intratekální anti-NFL IgM syntéza (anti-NFL index)



Obr. 12.1 F Intratekální anti-NFL IgG syntéza (anti-NFL index)



Vliv léčby na hladinu anti-NFL protilátek. Hladina intratekálních anti-NFL IgM protilátek byla podobná u neléčených, léčených pacientů s RS a u skupiny CN. Pacienti s RS bez léčby měli vyšší intratekální hladiny anti-NFL IgG než pacienti léčení kombinovanou imunosupresivní a imunomodulační léčbou ($p = 0.026$) nebo osoby ve skupině CN ($p = 0.009$). Intratekální hladina anti-NFL IgG protilátek byla podobná u pacientů s RS bez ohledu na typ léčby jako u osob ve skupině CN.

Korelace mezi CSF a sérem. Hladina sérových IgG protilátek proti NFL korelovala s hladinou mozkomíšních anti-NFL IgG protilátek ve skupině RS ($r = 0.5$, $p = 10^{-5}$) a ve skupině CN ($r = 0.5$, $p = 0.02$). Pro anti-NFL IgM protilátky taková vazba nebyla nalezena ani ve skupině RS ani CN.

Korelace mezi protilátkovými nálezy a demografickými údaji. Sérové anti-NFL IgG a intratekální anti-NFL IgG a IgM syntéza u pacientů s RS nezávisí na věku, trvání choroby, hodnotě EDSS nebo MSSS kromě jediné korelace mezi intratekální anti-NFL IgG syntézou a EDSS ($r = -0.3$, $p = 0.02$) nebo MSSS ($r = -0.3$, $p = 0.05$).

Ostatní korelace. Slabá korelace mezi IgG anti-NFL indexem a IgG indexem byla nalezena ve skupině RS ($r = 0.3$, $p = 0.04$) a žádná ve skupině CN. Intratekální anti-NFL syntéza IgG protilátek souvisela s intratekální syntézou anti-NFL IgM protilátek ($r = 0.4$, $p = 5 \cdot 10^{-4}$).

Opakovaná vyšetření intratekální anti-NFL syntézy. Hypotéza, že rozdíl mezi prvním a posledním vyšetřením u téhož pacienta je symetricky rozložen kolem nuly, byla testována Wilcoxonovým párovým testem. Významné rozdíly v čase nebyly nalezeny pro sérový nebo mozkomíšní albumin, IgG, anti-NFL IgG, anti-NFL IgM, IgG index a intratekální syntézu anti-NFL IgM a IgG protilátek.

12.2 Protilátky proti středně těžké podjednotce neurofilamentového tripletu

Klinické a laboratorní údaje jsou pro skupinu pacientů s RS shrnuty v tabulce 12.3 a pro kontrolní skupiny v tabulce 12.4. Věk v době lumbální punkce byl podobný ve skupině RS a CN ($p = 0.7$). Pacienti v obou těchto skupinách byli významně mladší než osoby v CD nebo CDEG. Věk v době lumbální punkce, trvání choroby a EDSS byly nižší ve skupině pacientů v RR fázi než u pacientů s progresivním typem průběhu RS ($p < 0.005$).

Tab. 12.3

Klinické a laboratorní nálezy u pacientů s roztroušenou sklerózou

Skupina	Všichni RS	RR RS	SP RS	PP RS
Počet pacientů	49	29	14	6
Ženské pohlaví (%)	71	72	64	83
Věk v době LP (roky)	38 (24-64)	30 (24-56)	50 (30-64)	51 (28-58)
Trvání choroby do doby LP (roky)	5 (0.58-41)	3 (0.5-26)	13.5 (2.5-41)	3 (0.5-13)
EDSS v době LP	3.0 (0-6.5)	2.0 (0-6.0)	5.0 (1-6.5)	4.7 (3-6)
MSSS	5.6 (0.2-9.7)	3.9 (0.2-9.7)	5.5 (0.2-8.8)	8.4 (6.7-9.4)
Léčba				
žádná	16	10	3	3
pouze imunosupresivní	20	11	6	3
imunosupresivní a imunomodulační	13	8	5	
IgG v séru (g/l)	9.2 (5.9-16.6)	8.8 (5.9-16.6)	9.2 (5.9-13.7)	10.5 (7.8-11.7)
IgG v moku (mg/l)	42 (13-260)	31 (17-120)	37 (13-260)	99 (41-170)
Poměr albuminu v séru/v moku ($\cdot 10^{-3}$)	5.0 (1.8-28.4)	5.0 (1.8-11.4)	5.0 (2.4-28.4)	4.9 (3.7-22.9)
IgG index	0.8 (0.4-2.4)	0.8 (0.4-2.1)	0.7 (0.4-2.4)	1.8 (0.9-2.3)

Hodnoty jsou uvedeny jako počet nebo medián (rozsah).

RS = roztroušená skleróza; RR = relaps-remitující; SP = sekundárně progresivní; PP = primárně progresivní; LP = lumbální punkce; EDSS = Expanded Disability Status Scale; MSSS = Multiple Sclerosis Severity Score; IgG = immunoglobulin G; imunosupresivní léčba = steroidy nebo azatioprin nebo obojí; imunomodulační léčba = interferony beta nebo glatiramer acetát; IgG index = (IgG v MMM/IgG v séru)/(albumin v MMM/albumin v séru).

Tab. 12.4

Klinické a laboratorní nálezy u kontrolních jedinců

Skupina	CN	CD	CDEG
Počet subjektů	16	21	14
Ženské pohlaví (%)	88	86	57
Věk v době LP (roky)	36 (17-54)	46 (19-78)	61 (26-78)
IgG v séru (g/l)	11.9 (7-15.7)	11.2 (7.3-16.6)	10 (5.5-17.9)
IgG v moku (mg/l)	28 (13-80)	27 (11-110)	30 (15-49)
Poměr albuminu v séru/v moku ($\cdot 10^{-3}$)	4.5 (2.3-9.7)	5.5 (2.0-16.2)	4.5 (2.6-13.4)
IgG index	0.5 (0.4-1.2)	0.5 (0.3-0.8)	0.6 (0.5-0.7)

Hodnoty jsou uvedeny jako počet nebo medián (rozsah).

LP = lumbální punkce; IgG = immunoglobulin G; CN = normální kontrolní jedinci; CD = kontrolní osoby s neurologickými chorobami; CDEG = kontrolní pacienti s neurodegenerativními chorobami; IgG index = (IgG v MMM/IgG v séru)/(albumin v MMM/albumin v séru).

Zhodnocení protilátek. Koncentrace celkových IgG v séru byla významně nižší u pacientů s RS ve srovnání se skupinami CN nebo CD. Celkové imunoglobuliny IgG v séru byly nižší u pacientů s RS užívající jakýkoli typ léčby než u pacientů s RS bez léčby ($p = 0.04$). Koncentrace celkových IgG v MMM byla významně vyšší u pacientů s RS při srovnání s ostatními kontrolními skupinami ($p < 0.04$). Albumin a IgG v MMM byly podobné u pacientů s RS bez léčby a u pacientů s RS a jakýmkoli druhem léčby. Porucha hematolickvorové bariéry byla přítomna u 8 % pacientů s RS a u 10 % kontrolních osob. IgG index byl významně zvýšen u pacientů s RS při srovnání s ostatními kontrolními skupinami ($p < 0.0001$).

Podobná protilátková odpověď *IgM* proti NFM v séru byla zjištěna ve skupině RS a ve všech kontrolních skupinách. Sérové anti-NFM *IgG* protilátky byly významně nižší u pacientů s RS při srovnání se skupinami CN nebo CD ($p < 0.008$) (obr. 12.2 A, B). Protilátky anti-NFM *IgM* a *IgG* v moku byly v podobné míře u skupiny RS a kontrolních skupinách s výjimkou zvýšené hladiny *IgM* u skupiny RS oproti skupině CN ($p = 0.01$) (obr. 12.2 C, D). **Intratekální produkce *IgG* a *IgM* protilátek proti NFM** byla významně vyšší u pacientů s RS než u skupiny CN nebo CD. Intratekální syntéza *IgG* a *IgM* protilátek proti NFM u skupiny RS byla podobná intratekální produkci pozorované ve skupině CDEG (obr. 12.2 E, F).

Zvýšená intratekální syntéza *IgG* a *IgM* se nelišila v podskupinách pacientů s různým typem průběhu (RR, SP, PP) (obr. 12.2 E,F). Pacienti s RR formou RS měli v době ataky podobné hladiny intratekálních anti-NFM protilátek *IgM* ($p = 0.12$) a *IgG* ($p = 0.25$) jako pacienti s RR průběhem v remisi. Nebyly nalezeny významné rozdíly v sérových, mozkomíšních a intratekálních anti-NF *IgG* a *IgM* protilátek mezi CN a CD. Pacienti s krátkým trváním choroby (< 1 rok odpovídající 25. percentilu) a s dlouhým trváním choroby (> 13 let, 75. percentil) měli podobné mozkomíšní a intratekální anti-NFM *IgG* nebo *IgM* protilátky a sérové anti-NFM

IgG. Sérové anti-NFM IgM byly vyšší u pacientů s krátkým trváním nemoci než u pacientů s delším trváním ($p = 0.007$).

Obr. 12.2 A-F

Hladina protilátek proti středně těžké podjednotce neurofilamentového tripletu (anti-NFM) vyjádřená v arbitrárních jednotkách nebo indexech zjištěné od pacientů s roztroušenou sklerózou (MS) jako celek, s relaps-remitujícím (RR) průběhem, se sekundárně progresivní (SP) roztroušenou sklerózou, s primárně progresivní (PP) průběhem, dále od normálních kontrolních jedinců (CN), od pacientů s různými neurologickými chorobami (CD) a pacientů s neurodegenerativními chorobami (CDEG). Arbitrární jednotky byly odečteny ze standardní kalibrační křivky. „p” znamená hladinu významnosti, NS znamená nevýznamný rozdíl.

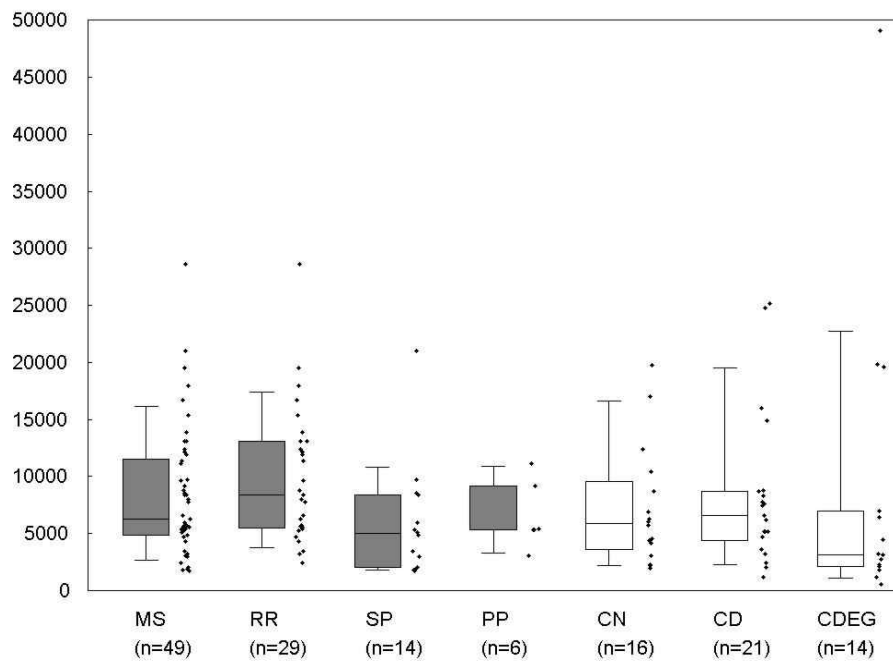
(A, B) Sérové protilátky proti NFM jsou podobné u různých skupin s výjimkou nižších hladin anti-NFM IgG protilátek u pacientů s RS oproti skupině CN nebo CD ($p < 0.008$).

(C, D) Anti-NFM protilátky v mozkomíšním moku byly podobné pro skupinu RS a ostatní kontrolní skupiny s výjimkou zvýšených hladin IgM u RS ve srovnání se skupinou CN ($p = 0.01$).

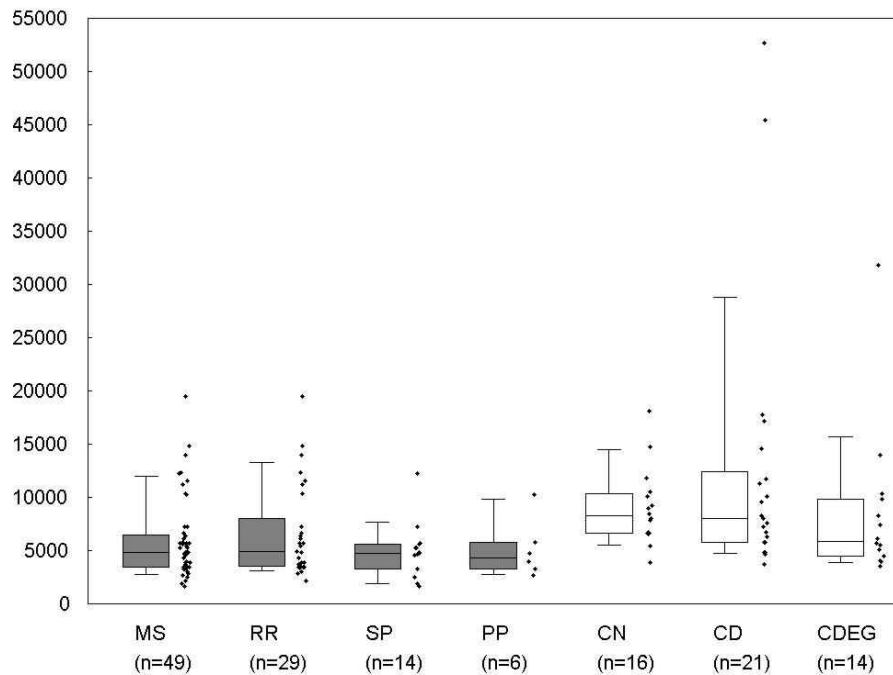
(E, F) Intratekálně produkované protilátky byly významně zvýšené u pacientů s RS oproti skupinám CN nebo CD. Intratekální syntéza u RS byla podobná produkci u skupiny CDEG pro obě třídy protilátek. Lokální IgM a IgG syntéza v CNS kompartmentu je podobně zvýšená pro podskupiny s RR, SP, PP průběhem.

Box graf znázorňuje medián (horizontální čára —), hodnoty mezi 25. a 75. percentilem (obdélníky □), svislé čáry nahoru a dolů vedou k 10., resp. 90. percentilu. Sousední bodová prezentace ukazuje jednotlivé hodnoty, z nichž byly odvozeny statistické charakteristiky. Šedé obdélníky patří pacientům s RS, bílé obdélníky vyjadřují výsledky kontrolních jedinců.

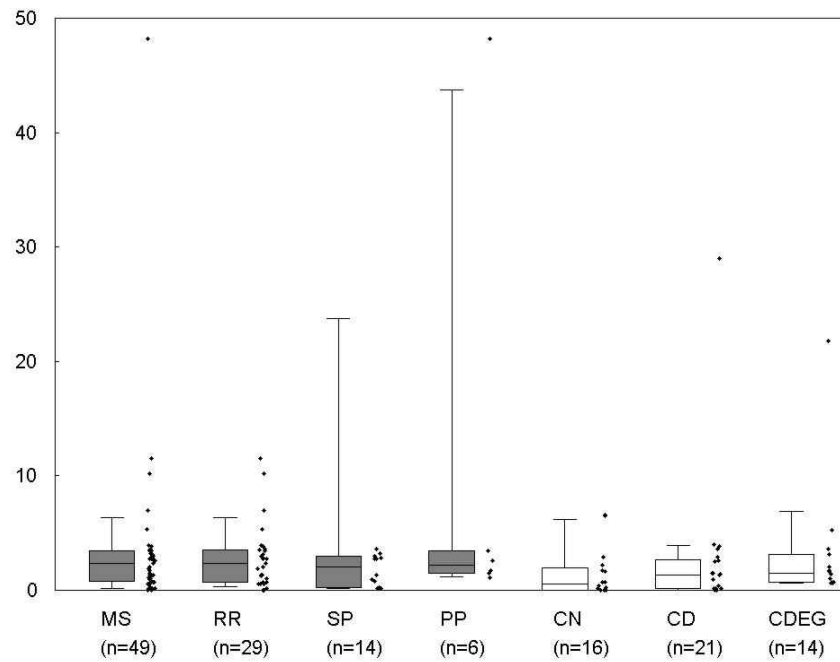
Obr. 12.2 A Sérové anti-NFM IgM (arbitrární jednotky)



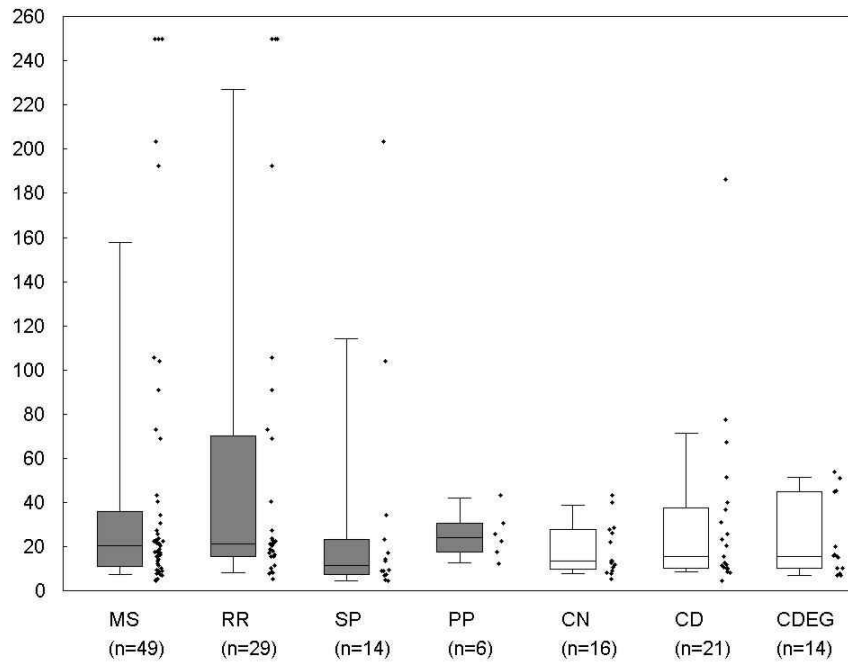
Obr. 12.2 B Sérové anti-NFM IgG (arbitrární jednotky)



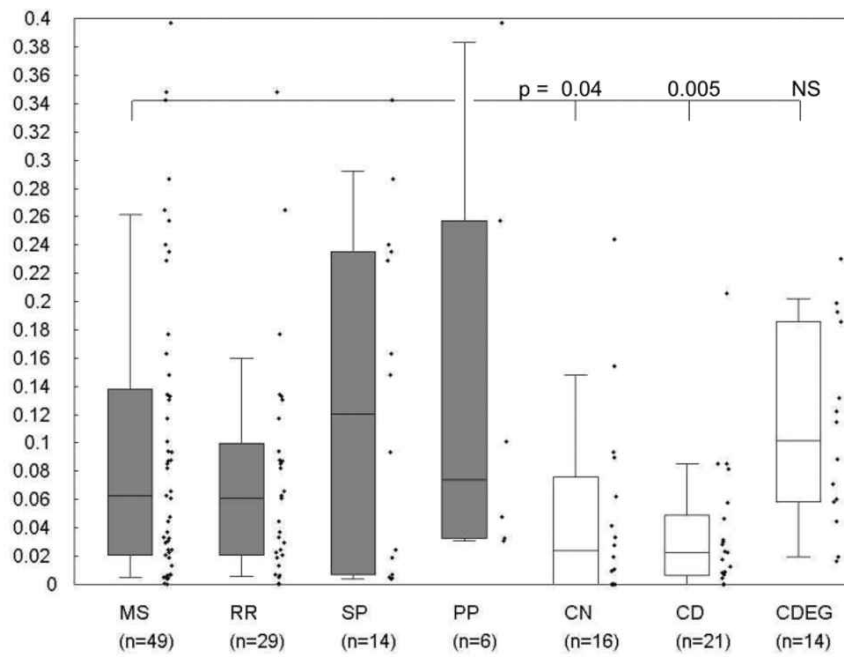
Obr. 12.2 C Mozkomíšní anti-NFM IgM (arbitrární jednotky)



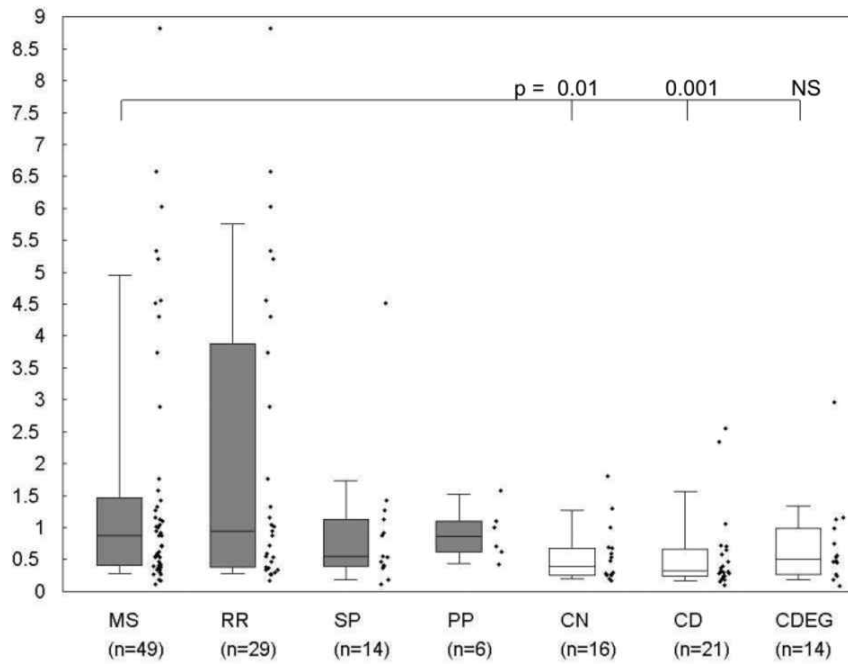
Obr. 12.2 D Mozkomíšní anti-NFM IgG (arbitrární jednotky)



Obr. 12.2 E Intratekální anti-NFM IgM syntéza (anti-NFM index)



Obr. 12.2 F Intratekální anti-NFM IgG syntéza (anti-NFM index)



Korelace mezi protilátkami v séru a moku. Nebyla nalezena vazba mezi hladinou IgM nebo IgG protilátek proti NFM v séru a v moku u skupiny RS a skupiny CN.

Korelace mezi laboratorními nálezy a demografickými ukazateli. Intratekální IgG a IgM syntéza u pacientů s RS nezávisí na pohlaví, věku, trvání choroby, hodnotě EDSS ani MSSS s výjimkou slabé inverzní korelace mezi EDSS a intratekální IgG syntézou ($r = -0.33$, $p = 0.002$). Míra intratekální anti-NFM IgM a IgG syntézy u skupiny CN a CDEG nesouvisela s věkem subjektů.

Ostatní korelace. Žádný vztah nebyl nalezen mezi IgG anti-NFM indexem a IgG indexem u skupiny RS. Anti-NF hladiny IgG protilátek souvisely s hladinami anti-NF IgM protilátek v séru ($r = 0.5$, $p = 0.0001$), mozkomíšním moku ($r = 0.4$, $p = 0.003$) a intratekálně ($r = 0.5$, $p = 0.0001$) u pacientů s RS.

Opakovaná vyšetření intratekální anti-NFM syntézy. Při zjišťování dynamiky protilátek s časem byla testována hypotéza, že rozdíl mezi opakovanými vyšetřeními u téhož pacienta je symetricky rozložen okolo nuly. Kritická hodnota Wilcoxonova párového testu je pět, ale testovací kritéria měla hodnotu nejméně jedenáct. Potvrdilo se, že se z dlouhodobého hlediska nemění IgG index, anti-NFM IgG, anti-NFM IgM a intratekální anti-NFM IgG a IgM protilátky.

Anti-NFM gradient mezi sérem a mozkomíšním mokem. Pokud se porovnaly absolutní semi-kvantitativní hladiny anti-NFM protilátek mezi sérem a mozkomíšním mokem u pacientů s RS, medián poměru sérum/mok činil přibližně 240:1 (rozsah 20-2 600) pro IgG a 3400:1 (rozsah 0-630 000) pro IgM. U normálních kontrol (CN) byla hladina anti-NFM IgG protilátek asi 600x (rozsah 200x-1 500x) vyšší a IgM hladina asi 2600x (rozsah 0-22 000x) vyšší v séru než v odpovídajícím mozkomíšním moku.

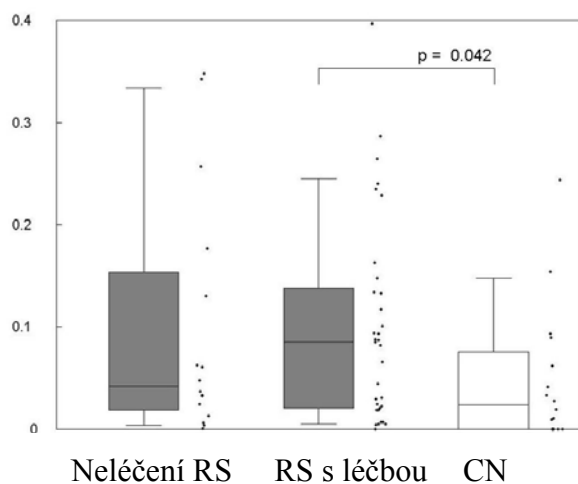
Vliv léčby na hladinu anti-NFM IgM protilátek (obr. 12.3 A). Hladina intratekálních anti-NFM IgM protilátek byla podobná u neléčených i léčených pacientů s RS a u neléčených pacientů s RS a

skupiny CN. Intratekální hladina anti-NFM IgM protilátek byla významně zvýšena u léčených pacientů s RS bez ohledu na léčbu při srovnání se skupinou CN ($p = 0.04$).

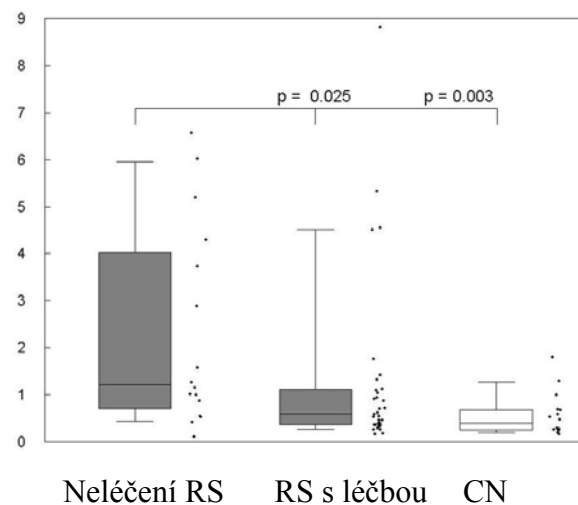
Vliv léčby na hladinu anti-NFM IgG protilátek (obr. 12.3 B). Neléčení pacienti s RS měli vyšší mozkomíšní ($p = 0.01$) nebo intratekální ($p = 0.025$) anti-NFM IgG hladinu protilátek než pacienti léčení kombinovanou imunosupresí a imunomodulací. Neléčení pacienti s RS měli významně vyšší mozkomíšní ($p = 0.035$) a intratekální ($p = 0.003$) anti-NFM IgG hladinu protilátek oproti osobám ve skupině CN. Intratekální anti-NFM IgG protilátky byly v podobné míře u pacientů s RS bez ohledu na typ léčby a u skupiny CN ($p = 0.07$).

Obr. 12.3 A, B Vliv léčby na hladinu anti-NF intratekální syntézy IgM (A) a IgG (B) protilátek u neléčených pacientů s RS, u pacientů s RS léčených imunomodulační a/nebo imunosupresivní léčbou (RS s léčbou) a u normálních kontrolních jedinců (CN). Jsou vyznačeny pouze významné rozdíly pro $p < 0.05$. Box ploty jsou uspořádány stejně jako na obrázcích 12.2 A-F. Zatímco intratekální IgM anti-NFM protilátky jsou zvýšené dokonce i u léčených pacientů s RS, hladiny IgG anti-NFM protilátek u léčené podskupiny pacientů s RS byly podobné jako u kontrolních jedinců. Osoby ze skupiny CN měly významně nižší hladiny intratekální anti-NFM IgG protilátek při srovnání s pacienty s RS bez nebo s léčbou.

Obr. 12.3 A



Obr. 12.3 B



13 Diskuze

Výsledky ukazují, že intratekální protilátky IgM a IgG proti axonálnímu proteinu NFM jsou u pacientů s RS zvýšené. V případě protilátek proti NFL je tento fakt platný pouze pro třídu protilátek IgG a nevyznívá tak jednoznačně, protože statisticky významný rozdíl byl nalezen ve vztahu ke skupině CD, nikoli však k CN. Tento výsledek je způsoben několika jedinci ze skupiny CN s vysokými anti-NFL indexy, nikoli nízkou hladinou anti-NFL protilátek u skupiny RS. Medián anti-NFL indexu pro IgG je identický pro skupinu CN a CD (0.3), což je nižší než u skupiny RS (0.6). Devadesátý percentil indexu je vyšší u skupiny CN než u skupiny CD a maximum indexu u skupiny CN (8.0) se blíží hodnotě u RS (8.5) (tabulka 12.1 A, obr. 12.1 F). Toto vysvětlení lze dokázat vznikem statistické významnosti po vyloučení tří pacientů ze skupiny CN s nejvyššími hodnotami anti-NFL indexu. Prověřili jsme údaje o čtyřech normálních jedincích vybočujících vysokou anti-NFL syntézou. Při opakované kontrole byla vyloučena laboratorní chyba (vzorky se stanovují ve dvojicích) nebo chyba při přepisování. Diagnózy těchto pacientů byly následující (v závorce je uvedena hodnota anti-NFL indexu): migréna (6.2), cefalea, chronický únavový syndrom a drúzové papily (1.0), syndrom tarzálního tunelu a deprese (2.2) a cervikokraniální syndrom (8.0). Není jasné, proč tyto normální jedinci vyvinuli takovou imunitní reakci. Vyšší hladinu anti-NFL protilátek v séru než hranice byla nalezena také u zdravých kontrol v jedné studii (Yano a kol. 2005).

Porovnání anti-NFL indexu u skupiny RS jako celku i podskupin RR, SP, PP s jinými pozorováními bylo možné díky tomu, že ve dvou studiích byla použit podobný biochemický přístup a indexy namísto absolutních hodnot k charakterizaci každého pacienta (Silber a kol. 2002; Eikelenboom 2003). Silber a kol. publikovali nezvyklé hodnoty pro anti-NFL indexy (ve stovkách).

Pravděpodobně jsou jen 1000násobně vyšší pro snadnější estetickou prezentaci. Medián a rozsah anti-NFL indexu pro všechny pacienty není udán, ale interkvartilový rozsah může být odvozen na hodnoty od 0.15 do 3.8 (Silber a kol. 2002). V návazné studii stejní autoři používající stejnou metodiku ukázaly v tabulce, že medián indexu pro pacienty s RS je kolem 0.22 a interkvartilový rozsah je mezi 0.14-0.33. Na jejich grafu bylo několik pacientů s anti-NFL indexem nad 75. percentilem (0.33) a maximální hodnoty dosahovaly přibližně 0.5 a 0.7 (Eikelenboom a kol. 2003). Naše výsledky vykazují celkově vyšší indexy a větší rozsah nejvyšších hodnot až k 8.5 (tab. 12.1). Není jasné, zda tyto variace jsou způsobeny mírně odlišnými imunochemickými technikami nebo rozdíly v populacích pacientů.

Anti-NF protilátky v našem souboru byly detekovány u osob s různými neurologickými chorobami vč. stavů nepodmíněných autoimunitními mechanismy a dokonce i u jedinců považované za normální kontroly nebo mající choroby bez vztahu k intratekálnímu prostoru jako cervikokraniální syndrom nebo neurastenien. Proto mohou být anti-NF protilátky považovány za přirozeně cirkulující autoprottilátky. Rozdíl oproti pacientům s RS tkví v jiné míře prottilátkových hladin.

Intratekální produkce specifických anti-NFL prottilátek slabě korelovala s intratekální syntézou celkových IgG. V případě anti-NFM prottilátek nebyl u pacientů s RS nalezen s IgG indexem žádný vztah. Znamená to, že humorální odpověď souvisela s antigenem málo a nezávisela na celkové polyspecifické humorální odpovědi IgG prottilátek.

Srovnatelně zvýšená hladina intratekálních anti-NF prottilátek u skupiny CDEG na úroveň pacientů s RS je poněkud nečekaným zjištěním. Rozpad neuronů může i u neurodegenerací vést k imunitní reakci na antigenní nervově specifickou nálož. Překvapivá je míra anti-NF reakce až na úroveň typicky autoimunitního onemocnění, jakým RS je. To poukazuje na společné rysy neurodegenerace a

imunitního postižení u obou skupin pacientů. Tento pohled je podporován jinými studii protilátek u neurodegenerativních chorob (Terryberry a kol. 1998; Karcher a kol. 1986; Couratier a kol. 1998).

Při podrobném rozboru skupiny pacientů s RS podle průběhu nemoci byly nalezeny zvýšené intratekální anti-NF IgG a IgM protilátky v podobné míře u pacientů s RR, SP a PP průběhem. Zvýšená anti-NF odpověď u pacientů s RR odpovídá histopatologickým a MR pozorováním, že axonální poškození se objevuje časných fázích RS (Kuhlman a kol. 2002; Filippi a kol. 2003; Miller a kol. 2003; De Stefano a kol. 2001).

V nedávných publikacích se intratekální hladina IgG protilátek proti NFL nelišila mezi RR, SP a PP (Eikelenboom a kol. 2003; Ehling a kol. 2004). Naproti tomu jiná studie ukázala, že intratekální produkce anti-NFL protilátek je větší v chronických formách než RR fázi (Silber a kol. 2002). Při porovnání klinických údajů našeho projektu s těmito třemi podobnými studii se zdá, že rozporné výsledky jsou nejspíše způsobeny odlišným trváním RR fáze. V naší studii a dvou dalších (Eikelenboom a kol. 2003; Ehling a kol. 2004) byl medián od tří do devíti let, zatímco pacienti s RR typem průběhem v poslední studii měli jasně kratší trvání s mediánem devíti měsíců (Silber a kol. 2002). Nezdá se, že by věk, pohlaví ani hodnota EDSS v těchto čtyřech studiích zodpovídaly za pozorované diskrepance. Lze tedy usuzovat, že pacienti s RR průběhem RS a kratším trváním choroby (zhruba méně než 1 rok) mají nižší hladinu anti-NF protilátek než pacienti s delším trváním. Různá doba od posledního relapsu může ovlivňovat míru anti-NF protilátek, což je uvedeno pouze v jediné studii (Eikelenboom a kol. 2003). U našich pacientů se produkce intratekálních anti-NF protilátek nelišila mezi pacienty v atace a nemocnými v remisi.

Sérové protilátky proti NF tripletu nebo podjednotkám lze detekovat u různých stavů jako např. u roztroušené sklerózy, Alzheimerovy choroby, Guillain-Barré syndromu, Parkinsonovy

demence a amyotrofické laterální sklerózy, systémového lupus erythematosus, syndromu opsoklonus-myoklonus a spongiformní encefalopatie, glaukomu, ale také u normálních jedinců (Yano a kol. 2005; Hughes a kol. 2001; Couratier a kol. 1998; Terryberry a kol. 1998; Chapman a kol. 1989; Bahmanyar a kol. 1983; Robbins a kol. 1988; Noetzel a kol. 1987; Karcher a kol. 1986; Stefansson a kol. 1985; Ehling a kol. 2004). U našich pacientů byly sérové anti-NF imunoglobuliny detekovány i u normálních jedinců (skupina CN), u nichž se nepředpokládalo organické postižení CNS. Zatímco hladiny IgM proti NFM nebo NFL byly v séru pacientů s RS podobné jako u ostatních kontrolních skupin, hladiny anti-NF IgG protilátek byly překvapivě nízké u pacientů s RS při srovnání s kontrolami. Souvisí to nejspíše se statisticky nižší koncentrací celkových IgG v séru našich pacientů s RS. Tento nález se však v jiných pracích neobjevuje (Gaertner a kol. 2004; Ehling a kol. 2004). Nízká sérová koncentrace celkových a tedy i anti-NF protilátek může být pravděpodobně způsobena léčbou, jak bylo pozorováno u našich pacientů. Podle našich výsledků nemůžeme potvrdit pozorování, že sérové anti-NFL protilátky jsou zvýšené u pacientů s primárně progresivní formou RS (Ehling a kol. 2004).

Hladina anti-neurofilamentových IgM nebo IgG protilátek **v mozkomíšním moku** se neliší mezi pacienty s RS a kontrolními skupinami až na drobné výjimky (IgM protilátky nižší u skupiny RS než CDEG v případě anti-NFL a vyšší u skupiny RS než CN v případě anti-NFM protilátek). Podobné semi-kvantitativní humorální odpovědi v séru nebo mozkomíšním moku podtrhují význam **intratekální** složky anti-NF protilátek při posuzování protilátkového stavu pacientů s RS.

Imunitní pochodům v CNS běžně chybí intratekální přesmyk z IgM do IgG odpovědi, což je obvyklé v krvi (Reiber a Peter 2001). Antigen – neurofilamenta – je u chronické choroby roztroušené sklerózy stále přítomen, takže vlastně nemůže ani nastat vzorec změny protilátek z IgM na IgG. Ani hladina anti-NFM IgG ani IgM

protilátek se nelišila u pacientů s RS s krátkým trváním od pacientů s dlouhým trváním. Navíc významná vazba mezi IgM a IgG anti-NF protilátkami v séru, mozkomíšním moku a intratekálně u našich pacientů zpochybňuje klasický přesmyk. Z těchto důvodů se zdá, že anti-NF IgM protilátky nekonvertují do IgG protilátek. Studie s longitudinálním uspořádáním by tento předpoklad potvrdila přesvědčivěji.

Zabývat se stanovováním intratekálních **IgM** protilátek proti NFL u **pacientů s RS** asi nemá smysl z několika důvodů. Hodnoty mozkomíšních a zvláště intratekálních anti-NF IgM protilátek byly velice nízké a blížily se nule s malým rozptylem. Žádný rozdíl anti-NFL IgM indexu nebyl shledán mezi skupinami RS, CN a CD. Navíc nebyla žádná vazba mezi sérovými a mozkomíšními IgM protilátkami. Hladina IgM protilátek u pacientů s RS nebyla ovlivněna léčbou. IgM mají také obecně známou větší nespecifickou adhezi k antigenům. Překvapivým zjištěním u pacientů s neurodegenerativními onemocněními byla vysoká hladina selektivně IgM protilátek (nikoli IgG) jak proti NFL (zde dokonce vyšší než u takového klasicky autoimunitního onemocnění jako je RS), tak NFM (zde srovnatelně s RS). Toto pozorování by si zasloužilo ověření na větší populaci.

Při analýze vztahu mezi **sérovými a mozkomíšními anti-NF protilátkami IgG** se liší výsledky podle neurofilamentové podjednotky. Zatímco u skupiny RS a CN pro IgG protilátky proti *středně těžké* podjednotce nebyla nalezena žádná vazba, v případě IgG protilátek proti *lehké* podjednotce souvisely mozkomíšní a sérové hladiny střední korelací. Toto pozorování zjištěné také jinými autory (Ehling a kol. 2004) může být užitečné při posuzování protilátkového stavu konkrétního pacienta. Odběr krve ke stanovení anti-NF protilátek může být proveden snadno namísto invazivní lumbální punkce. Používání sérových anti-NFL protilátek je však omezeno tím, že sérové IgG protilátky proti NFL u pacientů s RS jsou podobné nebo nižší (pravděpodobně vlivem léčby) než u

kontrolních pacientů v naší studii a ještě jiné práci (Yano a kol. 2005). Pro **IgM** protilátky proti NFL a NFM nebyla nalezena mezi sérem a mozkomíšním mokem žádná souvislost. Protože protilátková odpověď v mozkomíšním moku nemůže být předpovídána ze séra, protože se neliší anti-NFL IgG protilátky mezi skupinami a protože je důležitá intratekální frakce protilátek, nelze protilátkový stav pacienta posuzovat z pouhého sérového měření.

Vztah mezi hladinami **intratekálních anti-NF protilátek a klinickými parametry** včetně míry invalidizace u pacientů s RS nebyl prokázán. Toto pozorování vypovídá o tom, že přítomnost anti-NF protilátek je obecným rysem roztroušené sklerózy bez ohledu na klinické ukazatele. Jediná slabá souvislost spočívá v tom, že čím vyšší je intratekální syntéza anti-NF protilátek, tím nižší je invalidizace pacientů s RS. Význam tohoto vztahu je však pochybný. Žádný vztah mezi anti-NFL indexem a hodnotou EDSS, věkem subjektů nebo trváním choroby nebyl zjištěn (Eikelenboom a kol. 2003; Ehling a kol. 2004), zatímco v jedné studii souvisela protilátková produkce s trváním choroby nebo invalidizací (Silber a kol. 2002). Tyto rozdíly mohou být způsobeny odlišnostmi v populaci pacientů, biologické variabilitě pacientů se stejným statutem choroby, v antigenní specifitě nebo v ELISA technice.

Sériové vyšetřování mozkomíšního moku a séra u jednoho pacienta s RS ukázalo stabilitu anti-NF protilátek a intratekální anti-NF syntézy v čase a vyloučilo možnost, že míra protilátek odráží různé fáze onemocnění. Anti-NF index je spíše příznakem konkrétního pacienta, který se v průběhu onemocnění příliš nemění.

Pacienti s klinicky izolovaným syndromem (CIS) nevytvořili ohraničenou skupinu z hlediska anti-NFL protilátek. Pravděpodobně je to způsobeno malým počtem pacientů. Zajímavým faktem je zjištění, že úvodní fáze RS v podobě CIS by mohla být charakteristická nízkými sérovými a vysokými mozkomíšními hladinami anti-NFL IgM protilátek. Vyžaduje to ověření na větším souboru pacientů s CIS.

Koncentrační gradient anti-NFM protilátek mezi sérem a mozkomíšním mokem ukázal, že absolutní hladina protilátek je vyšší v séru. Toto pozorování bylo neočekávané, protože se dá předpokládat, že autoprottilátky vznikly proti nervově specifickým antigenům CNS. Původ těchto sérových protilátek je nejasný. Mohou vstoupit do séra z mozkomíšního moku nebo pocházet od B lymfocytů (plazmatických buněk), které byly aktivovány v oddílu mozkomíšního moku a potom migrují do séra, kde produkují autoprottilátky. V každém případě by to znamenalo opačný tok: z místa s nižší koncentrací buněk a protilátek v CNS do séra, kompartmentu s vyšší koncentrací buněk a protilátek. Pravděpodobnějším vysvětlením je přesun neurofilamentových antigenů z CNS do periferie, kde jsou sérové protilátky produkovány jako odpověď na nový antigení stimulus. NF jsou uvolněna z poškozených axonů během přerušení, Wallerovy degenerace a odumírání neuronů. Tyto cytoskeletální složky jsou degradovány a jsou detekovatelné v mozkomíšním moku u pacientů po relapsu (Lycke a kol. 1998; Semra a kol. 2002), během progresivní fáze RS (Petzold a kol. 2005; Eikelenboom a kol. 2005) a u všech typů průběhů RS (Malmstrom a kol. 2003; Norgren a kol. 2004). Rozpadlý cytoskeletální a myelinový materiál uvolněný z axonů je odstraňován makrofágy, které mohou být schopné dosáhnout periferie, např. krčních uzlin (Fabriek a kol. 2005). Významný rozdíl v absolutních hladinách protilátek mezi sérem a mozkomíšním mokem může být způsoben vyšší koncentrací plazmatických buněk v séru ve srovnání se zanedbatelným množstvím plazmatických buněk v mozkomíšním moku. Anti-NF protilátky mohou odrážet nejen uvolnění antigenů, ale mohou být generovány v rámci procesu molekulární mimikry. Podle tohoto konceptu jsou protilátky vytvářeny v důsledku přítomnosti exogenních struktur, např. peptidů odvozených od virových partikulí. Takové protilátky vzniklé v systémovém oběhu mohou zkříženě reagovat s neuronálními

antigeny (Prat a Antel 2005). Toto schéma dobře vysvětluje nerovnováhu anti-NF protilátek mezi sérem a mozkomíšním mokem.

Tato průřezová studie má řadu předností a omezení. Jako antigen byl zvolen axonálně-specifický neurofilamentový protein nevyskytující se v jiných strukturách CNS. Výhodou je použití čištěného nativního proteinu se všemi posttranslačními modifikacemi (fosforylace, glykosylace aj.) na rozdíl od rekombinantní verze neurofilament. Tak lze předpokládat, že konformace antigenu lépe odpovídá skutečné situaci v lidském organismu pacientů s RS. Je pravděpodobné, že zjišťované protilátky se skutečně vážou buď s NFL nebo s NFM, aniž by tyto proteiny byly kontaminovány dalšími podjednotkami neurofilament nebo jinými rozpadovými produkty. Podle informace výrobce neurofilament použítá metoda purifikace proteinů (kapalinová chromatografie HPLC) vylučuje kontaminaci zbývajícími neurofilamentovými podjednotkami. Nejběžnější proteázy mohou zkracovat neurofilamenta na alfa-helikální části o velikosti 40-60 kDa jako framgenty neurofilament. Vysoká čistota produktů je prokázána SDS-PAGE po barvení Coomassie. Denzitometrická charakterizace nezjistila žádné oblasti v regionu 40-60 kd. Naměřená kontaminace spočívala pouze v detekci malého rozpadového množství na počátku gelu. Konstrukce vlastních biochemických testů byla navržena tak, aby se snížila variabilita měření několika opatřeními: vztažením ke standardní křivce, analyzováním mozkomíšního moku a odpovídajícího séra od jednotlivých pacientů na té samé destičce a vypočítáváním poměru hodnot mezi sérovými a mozkomíšními ukazateli (tedy nikoli absolutní hodnoty). Intenzita protilátkové odpovědi byla vyjádřena semi-kvantitativně pro porovnávání a korelace. Současné stanovení IgM a IgG protilátek umožnilo studium jejich vztahů a jejich vazbu ke klinickým ukazatelům. Část antineuronálních protilátek by mohla být vázána v tkáni CNS nebo v imunitních komplexech s neurofilamenty, takže jejich detekce v séru a mozkomíšním moku může být omezená.

Výhodou prezentované studie je posuzování stavu roztroušené sklerózy a klinických ukazatelů jediným vyšetřujícím (doktorandem), aby byla zajištěna konzistence údajů pro účely srovnání. Opakovaná vyšetření vzorků u několika pacientů ukázala perzistující autoimunitní odpověď proti NF, a to i navzdory intenzivní imunopresivní intervenci prostřednictvím intratekální aplikace imunopresiv. Většina pacientů s RS nemohla být vzhledem k aktivitě choroby ponechána bez léčby. Proto výsledky by měly být posuzovány opatrně. Léčba měla odlišný vliv na anti-NF status ve třídě IgM a IgG. Intratekální hladiny anti-NF IgM protilátek byly zvýšené i u pacientů s RS s léčbou. V případě IgG protilátek byly hladiny podobné u léčených pacientů s RS jako u kontrol (obr. 12.3 A,B). Lze spekulovat, že jakákoli léčba může snížit anti-NFM IgG produkci, zatímco IgM reakce je zachována navzdory léčbě. Bylo by žádoucí ověření, zda tyto pozorované změny v odpovědích IgM a IgG v závislosti na léčbu jsou náhodné nebo reprodukovatelné.

Závěrem lze shrnout nejdůležitější zjištění, že:

- protilátková odpověď proti neurofilamentům existuje ve zvýšené míře u roztroušené sklerózy a ve třídě IgM u neurodegenerací,
- odlišnost mezi skupinami není tak výrazná pro protilátky proti lehké podjednotce neurofilamentového tripletu jako pro protilátky proti středně těžké podjednotce,
- nebyla nalezena hlubší asociace mezi protilátkovým stavem pacienta a klinickými parametry včetně míry progresu onemocnění.

Pokračování v hledání dalších biologických ukazatelů axonální destrukce u pacientů s roztroušenou sklerózou je užitečné proto, aby se vymezily podskupiny pacientů s podobnými charakteristikami, vytipovali vhodní pacienti ohrožení rychlejší deteriorací, aby se

uplatnily při rozhodování o další léčebné strategii a přinesly nové poznatky o patogenezi nemoci.

14 Literatura

1. Acarin N, Rio J, Fernandez AL, Tintore M, Duran I, Galan I, et al. Different antiganglioside antibody pattern between relapsing-remitting and progressive multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1996; 93:99-103.
2. Alcazar A, Regidor I, Masjuan J, Salinas M, Alvarez-Cermeno JC. Axonal damage induced by cerebrospinal fluid from patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 104:58-67.
3. Al-Chalabi A, Miller CC. Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays* 2003; 25:346-55.
4. Almeras L, Lefranc D, Drobecq H, de Seze J, Dubucquoi S, Vermersch P, et al. New antigenic candidates in multiple sclerosis: identification by serological proteome analysis. *Proteomics* 2004; 4:2184-94.
5. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57:897-902.
6. Archelos JJ, Storch MK, Hartung HP. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000; 47:694-706.
7. Bahmanyar S, Moreau-Dubois MC, Brown P, Cathala F, Gajdusek DC. Serum antibodies to neurofilament antigens in patients with neurological and other diseases and in healthy controls. *J Neuroimmunol* 1983; 5:191-6.
8. Banik NL, Matzelle DC, Gantt-Wilford G, Osborne A, Hogan

9. Bartoš A, Piřha J. Roztrouřená skleróza. *Causa Subita* 2004; 7(2): 41-43
10. Bartoš A, řřourač P, Rusina R, řvejdová M, Velenská Z. Paraneoplastische Degeneration des Kleinhirns bei einem Ovarialkarzinom: anti-Yo positive Immunreaktivität der Kleinhirn- und Tumorzellen. *Nervenarzt* 2002; 73: 995-998.
11. Bednarova J, Stourac P, Adam P. Relevance of immunological variables in neuroborreliosis and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2005; 112:97-102.
12. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 2003; 349:139-45.
13. Bergers E, Bot JC, De Groot CJ, Polman CH, Lycklama a Nijeholt GJ, Castelijns JA, et al. Axonal damage in the spinal cord of MS patients occurs largely independent of T2 MRI lesions. *Neurology* 2002; 59:1766-71.
14. Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain* 2004; 127:1463-78.
15. Bitsch A, Dressel A, Meier K, Bogumil T, Deisenhammer F, Tumani H, et al. Autoantibody synthesis in primary progressive multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. *J Neurol* 2004; 251:1498-501.
16. Bitsch A, Kuhlmann T, Stadelmann C, Lassmann H, Lucchinetti C, Bruck W. A longitudinal MRI study of histopathologically

17. Bjartmar C, Kinkel RP, Kidd G, Rudick RA, Trapp BD. Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS. *Neurology* 2001; 57:1248-52.
18. Bjartmar C, Wujek JR, Trapp BD. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J Neurol Sci* 2003; 206:165-71.
19. Bornstein NM, Aronovich B, Korczyn AD, Shavit S, Michaelson DM, Chapman J. Antibodies to brain antigens following stroke. *Neurology* 2001; 56:529-30.
20. Brandt R. Cytoskeletal mechanisms of neuronal degeneration. *Cell Tissue Res* 2001; 305:255-65.
21. Bruck W, Stadelmann C. The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. *Curr Opin Neurol* 2005; 18:221-4.
22. Bruck W. Inflammatory demyelination is not central to the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurol* 2005; 252 Suppl 5:v10-5.
23. Cid C, Alvarez-Cermeno JC, Camafeita E, Salinas M, Alcazar A. Antibodies reactive to heat shock protein 90 induce oligodendrocyte precursor cell death in culture. Implications for demyelination in multiple sclerosis. *FASEB J* 2004; 18:409-11.
24. Coleman M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6:889-98.
25. Couratier P, Yi FH, Preud'homme JL, Clavelou P, White A, Sindou P, et al. Serum autoantibodies to neurofilament proteins in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1998; 154:137-45.

26. Cross AH, Stark JL. Humoral immunity in multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Res* 2005; 32:85-98.
27. Cross AH, Trotter JL, Lyons J. B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 2001; 112:1-14.
28. De Stefano N, Bartolozzi ML, Guidi L, Stromillo ML, Federico A. Magnetic resonance spectroscopy as a measure of brain damage in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2005; 233:203-8.
29. De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Arnaoutelis R, Tartaglia MC, Antel JP, et al. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol* 2001; 58:65-70.
30. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, Sellebjerg F. EFNS guidelines on routine CSF analysis. *European Journal of Neurology* 2006, in press
31. Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E. Intrathecal antibody (IgG) production against human herpesvirus type 6 occurs in about 20% of multiple sclerosis patients and might be linked to a polyspecific B-cell response. *J Neurol* 2005; 252:968-71.
32. Dharmasaroja P. Specificity of autoantibodies to epitopes of myelin proteins in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2003; 206:7-16.
33. Dráberová E. Cytoskelet – dynamická síť. *Vesmír* 2000; 70/130 (8): 438-445.
34. Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2006;

35. Ebringer A, Hughes L, Rashid T, Wilson C. *Acinetobacter* immune responses in multiple sclerosis: etiopathogenetic role and its possible use as a diagnostic marker. *Arch Neurol* 2005; 62:33-6.
36. Ehling R, Lutterotti A, Wanschitz J, Khalil M, Gneiss C, Deisenhammer F, et al. Increased frequencies of serum antibodies to neurofilament light in patients with primary chronic progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2004; 10:601-6.
37. Eikelenboom MJ, Petzold A, Lazeron RH, Silber E, Sharief M, Thompson EJ, et al. Multiple sclerosis: Neurofilament light chain antibodies are correlated to cerebral atrophy. *Neurology* 2003; 60:219-23.
38. Evangelou N, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM. Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2000; 47:391-5.
39. Fabriek BO, Zwemmer JN, Teunissen CE, Dijkstra CD, Polman CH, Laman JD, et al. In vivo detection of myelin proteins in cervical lymph nodes of MS patients using ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology. *J Neuroimmunol* 2005; 161:190-4.
40. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997; 120 (Pt 3):393-9.
41. Filippi M, Bozzali M, Rovaris M, Gonen O, Kesavadas C, Ghezzi A, et al. Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. *Brain* 2003; 126:433-7.
42. Filippi M, Rocca MA. MRI evidence for multiple sclerosis as a

43. Filippi M. In-vivo tissue characterization of multiple sclerosis and other white matter diseases using magnetic resonance based techniques. *J Neurol* 2001; 248:1019-29.
44. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 2005; 62:865-70.
45. Friedecký B, Štern P, Vávrová J, Palička V. Soudobé biochemické ukazatele srdečního poškození. *Klin Biochem Metab* 2000; 8 (4): 264-270.
46. Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 1998; 279:514-9.
47. Gaertner S, de Graaf KL, Greve B, Weissert R. Antibodies against glycosylated native MOG are elevated in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 63:2381-3.
48. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 1999; 5:170-5.
49. Gotow T. Neurofilaments in health and disease. *Med Electron Microsc* 2000; 33:173-99.
50. Havrdová E a kol. *Neuroimunologie*. Maxdorf Jessenius, Praha, 2001
51. Havrdová E, Horáková D. Roztroušená skleróza. *Postgraduální medicína* 2004; 6 (4): 382-389.

52. Heinzlef O, Weill B, Johanet C, Sazdovitch V, Caillat-Zucman S, Tournier-Lasserre E, et al. Anticardiolipin antibodies in patients with multiple sclerosis do not represent a subgroup of patients according to clinical, familial, and biological characteristics. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72:647-9.
53. Hořejší V, Bartůňková J. *Základy imunologie*. Triton, Praha, 1998
54. Hu YY, He SS, Wang XC, Duan QH, Khatoon S, Iqbal K, et al. Elevated levels of phosphorylated neurofilament proteins in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients. *Neurosci Lett* 2002; 320:156-60.
55. Hughes LE, Bonell S, Natt RS, Wilson C, Tiwana H, Ebringer A, et al. Antibody responses to *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in multiple sclerosis: prospects for diagnosis using the myelin-acinetobacter-neurofilament antibody index. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8:1181-8.
56. Hughes LE, Smith PA, Bonell S, Natt RS, Wilson C, Rashid T, et al. Cross-reactivity between related sequences found in *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003; 144:105-15.
57. Chapman J, Bachar O, Korczyn AD, Wertman E, Michaelson DM. Alzheimer's disease antibodies bind specifically to a neurofilament protein in Torpedo cholinergic neurons. *J Neurosci* 1989; 9:2710-7.
58. Chiba S, Yokota S, Yonekura K, Tanaka S, Furuyama H, Kubota H, et al. Autoantibodies against HSP70 family proteins were detected in the cerebrospinal fluid from patients with multiple

59. Izquierdo G, Angulo S, Garcia-Moreno JM, Gamero MA, Navarro G, Gata JM, et al. Intrathecal IgG synthesis: marker of progression in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2002; 105:158-63.
60. Julien JP. Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9:554-60.
61. Karcher D, Federspiel BS, Lowenthal FD, Frank F, Lowenthal A. Anti-neurofilament antibodies in blood of patients with neurological diseases. *Acta Neuropathol (Berl)* 1986; 72:82-5.
62. Keegan M, Konig F, McClelland R, Bruck W, Morales Y, Bitsch A, et al. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet* 2005; 366:579-82.
63. Kolar OJ, Havrdová E, Piřha J. Trends to individualized treatment of multiple sclerosis. *Čes. a slov. Neurol. Neurochir.* 2004; 67/100 (6): 401 - 408.
64. Krejssek J, Kopecký O, Taláb R. Imunopatogeneze roztroušené sklerózy. *Neurol pro Praxi* 2002; 3 (5): 236-243.
65. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 2002; 125:2202-12.
66. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33:1444-52.
67. Lampasona V, Franciotta D, Furlan R, Zanaboni S, Fazio R,

68. Lariviere RC, Julien JP. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol* 2004; 58:131-48.
69. Lassmann H. Axonal injury in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74:695-7.
70. Lee MK, Cleveland DW. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 1996; 19:187-217.
71. Lily O, Palace J, Vincent A. Serum autoantibodies to cell surface determinants in multiple sclerosis: a flow cytometric study. *Brain* 2004; 127:269-79.
72. Lim ET, Berger T, Reindl M, Dalton CM, Fernando K, Keir G, et al. Anti-myelin antibodies do not allow earlier diagnosis of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005; 11:492-4.
73. Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977; 37:397-401.
74. Lovas G, Szilagyi N, Majtenyi K, Palkovits M, Komoly S. Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain* 2000; 123 (Pt 2):308-17.
75. 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; 46:907-11.

76. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47:707-17.
77. 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; 64:402-4.
78. 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; 61:1720-5.
79. Markovic M, Trajkovic V, Drulovic J, Mesaros S, Stojisavljevic N, Dujmovic I, et al. Antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 2003; 211:67-73.
80. Martino G, Adorini L, Rieckmann P, Hillert J, Kallmann B, Comi G, et al. Inflammation in multiple sclerosis: the good, the bad, and the complex. *Lancet Neurol* 2002; 1:499-509.
81. Mayo I, Arribas J, Villoslada P, Alvarez DoForno R, Rodriguez-Vilarino S, Montalban X, et al. The proteasome is a major autoantigen in multiple sclerosis. *Brain* 2002; 125:2658-67.
82. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50:121-7.
83. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJ, Thompson AJ. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 2002; 125:1676-95.

84. Miller DH, Thompson AJ, Filippi M. Magnetic resonance studies of abnormalities in the normal appearing white matter and grey matter in multiple sclerosis. *J Neurol* 2003; 250:1407-19.
85. Nixon RA. The regulation of neurofilament protein dynamics by phosphorylation: clues to neurofibrillary pathobiology. *Brain Pathol* 1993; 3:29-38.
86. Noetzel MJ, Cawley LP, James VL, Minard BJ, Agrawal HC. Anti-neurofilament protein antibodies in opsoclonus-myoclonus. *J Neuroimmunol* 1987; 15:137-45.
87. Norgren N, Rosengren L, Stigbrand T. Elevated neurofilament levels in neurological diseases. *Brain Res* 2003; 987:25-31.
88. Norgren N, Sundstrom P, Svenningsson A, Rosengren L, Stigbrand T, Gunnarsson M. Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 63:1586-90.
89. Nylen K, Karlsson JE, Blomstrand C, Tarkowski A, Trysberg E, Rosengren LE. Cerebrospinal fluid neurofilament and glial fibrillary acidic protein in patients with cerebral vasculitis. *J Neurosci Res* 2002; 67:844-51.
90. O'Connor KC, Chitnis T, Griffin DE, Piyasirisilp S, Bar-Or A, Khoury S, et al. Myelin basic protein-reactive autoantibodies in the serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients are characterized by low-affinity interactions. *J Neuroimmunol* 2003; 136:140-8.
91. Petzold A, Eikelenboom MJ, Keir G, Grant D, Lazeron RH, Polman CH, et al. Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76:206-11.

92. Petzold A. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci* 2005; 233:183-98.
93. Piřha J, Havrdová E. Axonální patologie u roztroušené sklerózy. *Čes a slov Neurol. Neurochir.* 2005; 68/101 (3): 154 – 158.
94. Piřha J. Novinky a trendy v terapii roztroušené sklerózy. *Farmakoterapie* 2005 1 (6): 550 – 555.
95. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005; 58:840-6.
96. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13:227-31.
97. Prat A, Antel J. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2005; 18:225-30.
98. Qin Y, Duquette P. B-cell immunity in MS. *Int MS J* 2003; 10:110-20.
99. Reder AT, Oger JJ. Anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 62:1922-3.
100. Reiber H, Lange P. Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin Chem* 1991; 37:1153-60.
101. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001; 184:101-22.

102. Reindl M, Khantane S, Ehling R, Schanda K, Lutterotti A, Brinkhoff C, et al. Serum and cerebrospinal fluid antibodies to Nogo-A in patients with multiple sclerosis and acute neurological disorders. *J Neuroimmunol* 2003; 145:139-47.
103. Reindl M, Linington C, Brehm U, Egg R, Dilitz E, Deisenhammer F, 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 (Pt 11):2047-56.
104. Rieckmann P, Maurer M. Anti-inflammatory strategies to prevent axonal injury in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2002; 15:361-70.
105. Robbins ML, Kornguth SE, Bell CL, Kalinke T, England D, Turski P, et al. Antineurofilament antibody evaluation in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Combination with anticardiolipin antibody assay and magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 1988; 31:623-31.
106. 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; 67:2013-8.
107. Rosengren LE, Karlsson JE, Sjogren M, Blennow K, Wallin A. Neurofilament protein levels in CSF are increased in dementia. *Neurology* 1999; 52:1090-3.
108. Rovaris M, Gambini A, Gallo A, Falini A, Ghezzi A, Benedetti B, et al. Axonal injury in early multiple sclerosis is irreversible and independent of the short-term disease evolution. *Neurology* 2005; 65:1626-30.
109. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer

110. Sadatipour BT, Greer JM, Pender MP. Increased circulating antiganglioside antibodies in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998; 44:980-3.
111. Sastre-Garriga J, Tintore M, Rovira A, Grive E, Pericot I, Comabella M, et al. Conversion to multiple sclerosis after a clinically isolated syndrome of the brainstem: cranial magnetic resonance imaging, cerebrospinal fluid and neurophysiological findings. *Mult Scler* 2003; 9:39-43.
112. Sellebjerg F, Jensen CV, Christiansen M. Intrathecal IgG synthesis and autoantibody-secreting cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 108:207-15.
113. 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; 122:132-9.
114. Silber E, Semra YK, Gregson NA, Sharief MK. Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit. *Neurology* 2002; 58:1372-81.
115. Sorensen PS. Treatment of multiple sclerosis with intravenous immunoglobulin: review of clinical trials. *Neurol Sci* 2003; 24 Suppl 4:S227-30.
116. Stefansson K, Marton LS, Dieperink ME, Molnar GK, Schlaepfer WW, Helgason CM. Circulating autoantibodies to the 200,000-dalton protein of neurofilaments in the serum of healthy individuals. *Science* 1985; 228:1117-9.

117. Studahl M, Rosengren L, Gunther G, Hagberg L. Difference in pathogenesis between herpes simplex virus type 1 encephalitis and tick-borne encephalitis demonstrated by means of cerebrospinal fluid markers of glial and neuronal destruction. *J Neurol* 2000; 247:636-42.
118. Sueoka E, Yukitake M, Iwanaga K, Sueoka N, Aihara T, Kuroda Y. Autoantibodies against heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 in CSF of MS patients. *Ann Neurol* 2004; 56:778-86.
119. Štourač 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): 204-208.
120. Štourač P. Imunomodulační terapie u sclerosis multiplex. *Neurologie pro praxi* 2002; 5: 256-259.
121. Štourač P. Paraneoplastické autoimunitní neurologické syndromy. *Čes a slov Neurol a Neurochir* 2005; 68/101 (2): 80-89.
122. Terryberry JW, Thor G, Peter JB. Autoantibodies in neurodegenerative diseases: antigen-specific frequencies and intrathecal analysis. *Neurobiol Aging* 1998; 19:205-16.
123. Teunissen CE, Dijkstra C, Polman C. Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2005; 4:32-41.
124. Tibbling G, Link H, Ohman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest* 1977; 37:385-90.

125. Tichý M, Gregor J. Přehled biochemických markerů poškození myokardu. *Klin Biochem Metabol* 2002; 10 (3): 176-179.
126. 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; 338:278-85.
127. Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol* 1999; 12:295-302.
128. van Walderveen MA, Kamphorst W, Scheltens P, van Waesberghe JH, Ravid R, Valk J, et al. Histopathologic correlate of hypointense lesions on T1-weighted spin-echo MRI in multiple sclerosis. *Neurology* 1998; 50:1282-8.
129. Villar LM, Masjuan J, Gonzalez-Porque P, Plaza J, Sadaba MC, Roldan E, et al. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003; 53:222-6.
130. Vincent A, Lily O, Palace J. Pathogenic autoantibodies to neuronal proteins in neurological disorders. *J Neuroimmunol* 1999; 100:169-80.
131. Wang J, Tung YC, Wang Y, Li XT, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Hyperphosphorylation and accumulation of neurofilament proteins in Alzheimer disease brain and in okadaic acid-treated SY5Y cells. *FEBS Lett* 2001; 507:81-7.
132. Warrington AE, Asakura K, Bieber AJ, Ciric B, Van Keulen V, Kaveri SV, et al. Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:6820-5.
133. Wekerle H, Hohlfeld R. Molecular mimicry in multiple

134. Working group. Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. *Neurobiol Aging* 1998; 19:109-16.
135. Yano T, Yamada K, Kimura A, Takeshita T, Minohara M, Kira J, et al. Autoimmunity against neurofilament protein and its possible association with HLA-DRB1*1502 allele in glaucoma. *Immunol Lett* 2005; 100:164-9.
136. Yao SY, Stratton CW, Mitchell WM, Sriram S. CSF oligoclonal bands in MS include antibodies against Chlamydomophila antigens. *Neurology* 2001; 56:1168-76.
137. Zhu B, Moore GR, Zwimpfer TJ, Kastrukoff LF, Dyer JK, Steeves JD, et al. Axonal cytoskeleton changes in experimental optic neuritis. *Brain Res* 1999; 824:204-17.

15 Summary

Background. There is histopathological and magnetic resonance evidence of widespread and early axonal damage in multiple sclerosis (MS). Neurofilaments are cytoskeletal neuron-specific proteins localized within axons, which may interact with the immune system during and following tissue destruction in multiple sclerosis. These proteins may be released in MS, mounting an inflammatory response. Antibodies against neurofilaments synthesized intrathecally may reflect axonal damage in MS patients and may be a useful biomarker for disease activity and possible sustained disability caused by accumulation of repetitive axonal damage.

Aim. To address a question whether antibodies against cytoskeletal proteins, namely the neurofilament light chain (NFL) and medium chain (NFM), are of relevance in patients suffering from MS. To compare the intrathecal synthesis of these antibodies between the patient groups. To analyze the correlation between antibodies and clinical features of the MS group.

Patients and methods. We have collected a large sample library consisting of MS patients with different disease courses, normal controls and also patients suffering from neurodegenerative disorders. We have put a lot of effort into analyzing cerebrospinal fluid and serum samples using an in-house developed ELISA technique. Both immunoglobulin G (IgG) and M (IgM) antibodies against the purified native light subunit of neurofilaments (NFL) using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were determined in paired serum and cerebrospinal fluid samples obtained from 58 MS patients, 24 normal controls (CN), 49 control patients with miscellaneous diseases (CD) and 31 patients with neurodegenerative disorders (CDEG). The same was done for the determination of antibodies against the purified native medium subunit of neurofilaments (NFM) in 49 MS patients, 16 normal

controls (CN), 21 control patients with miscellaneous diseases (CD) and 14 patients with neurodegenerative disorders (CDEG).

Results. Intrathecal production of IgG antibodies to *NFL* was elevated in MS patients compared to CD patients ($p = 0.002$), but not to CN subjects because of high levels in some CN individuals. No difference in intrathecal anti-NFL IgM levels between MS patients and CN/CD was found. Intrathecal synthesis of IgM to NFL was higher in CDEG group than in CN, CD or even MS groups ($p < 0.01$). Anti-NFL IgG levels in serum correlated to those in CSF in the MS group ($r = 0.5$, $p = 10^{-5}$) and in the CN group ($r = 0.5$, $p = 0.02$). Repeated examinations showed stable intrathecal anti-NFL production.

Intrathecal production of IgM and IgG antibodies to *NFM* were elevated in MS patients compared to the CN or CD groups ($p < 0.04$ for IgM, $p < 0.01$ for IgG). The increase was present in all the MS courses (relapsing-remitting, primary and secondary progressive). Similar local IgG and IgM synthesis occurred in the MS and CDEG groups. MS patients with short and long disease duration did not differ in terms of their anti-NFM IgM and IgG responses. Repeated examinations showed stable intrathecal anti-NFM production.

Conclusions. Intrathecal synthesis of anti-*NFL* antibodies may be increased in a MS subgroup. The IgG antibody anti-NFL response in the CSF can be estimated from serum. Determination of IgM antibodies to NFL in MS is not useful, but may be of relevance in neurodegenerative disorders.

Intrathecal IgG and IgM antibodies against *NFM* were increased in MS patients and may serve as a potential marker for axonal pathology. The extent of anti-NFM levels did not correspond to any individualized clinical profiles of MS patients.

16 Poděkování

Klikatá cesta k dizertační práci je lemována řadou osob, bez nichž by nebylo možné dosáhnout cíle. Dovoluji si proto poděkovat následujícím osobám:

Prof. MUDr. Pavlu Kalvachovi, CSc., přednostovi Neurologické kliniky UK 3. LF a mému školiteli, za umožnění zahraničních neuroimunologických stáží, finanční podporu projektu a pečlivé čtení rukopisů odborných článků a dizertace,

prim. MUDr. Jiřímu Piřhovi, vedoucímu RS Centra, za vybudování specializované poradny, soustředěné péče o pacienty a za umožnění podílet se na činnosti RS Centra. Zde bylo možno načerpat jak zkušenosti, tak vytvářet velké soubory pacientů do publikací a dizertace,

MUDr. Lence Fialové, CSc. z Ústavu lékařské biochemie, UK 1. LF, Praha, stěžejní osobnosti za hladkou spolupráci, rozvinutí ELISA metodiky a praktické provedení imunochemických analýz,

Doc. ing. Jaromíru Kukulovi, PhD z VŠCHT za rozšíření obzorů a entuziazmus při společných diskusích nad statistickým vyhodnocováním a zpracováváním velkého množství různorodých výsledků výzkumné činnosti,

Doc. MUDr. Ivanu Malbohanovi, CSc., vedoucímu Imunochemického oddělení, Ústavu lékařské biochemie a Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, UK 1. LF, Praha, za souhlas s realizací nápadu a projektu na jeho pracovišti, když jsem ho v roce 2000 oslovil s nabídkou spolupráce po odmítnutí na

několika jiných předchozích pracovištích, a to aniž bych na počátku mohl nabídnout finanční krytí,

MUDr. Jiřině Soukupové z Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, UK 1. LF, Praha, za rozvinutí metodiky a imunochemické stanovení na vzorcích od pacientů,

prim. MUDr. Benákové z Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, UK 1. LF, Praha, za stanovení koncentrace imunoglobulinů a albuminu v mozkomíšním moku a séru pacientů,

dr. Ridzoňovi a dr. Rusinovi z Neurologické kliniky FTN Krč za možnost podílet se grantu týkajícího se amyotrofické laterální sklerózy z imunochemického hlediska a poskytnutí části vzorků od pacientů,

Prof. MUDr. Richardu Rokytovi, DrSc., přednostovi Ústavu normální, patologické a klinické fyziologie, UK 3. LF za finanční podporu projektu z jeho předchozího a současného výzkumného záměru 3. lékařské fakulty,

těm lékařům Neurologické kliniky, UK 3. LF, kteří pomáhali se sběrem vzorků od pacientů.

Děkuji mé manželce **Jitce** za toleranci a podporu, kterou projevovala mé činnosti během celého projektu i v době sepisování publikací a dizertace.

Dizertační práce byla podpořena výzkumným záměrem MŠMT Patofyziologie neuropsychiatrických onemocnění a její klinické aplikace č. 0021620816.

Bartoš

Od: "Ivan Malbohan" <imal@lf1.cuni.cz>
Komu: "Ales Bartos,M.D." <bartos@fnkv.cz>
Odesláno: 1. dubna 2003 14:54
Předmět: Re: neurofilamenta

Pane doktore,
máme první výsledky, zavolejte mně nebo paní RNDr
Soukupové, která ELISU na neurofilamenta prováděla ohledně interpretace
výsledků. Rozdíl mezi " normály" a "patologiemi" jsme snad našli, ale nejsou
příliš výrazné. Zdraví Dr. Malbohan

Neurofilamenta - 68 000

(absorbance)
negativní kontroly
24-Jedličková
30-Motl
62-Kopecská

lg G

sérum	likvor
400x řed.	neředěno
0,20	0,26
0,23	0,26
0,26	0,26

pozitivní kontroly
X1-Maršíková
X2-Pavel
X3-Folbrechtová

sérum	likvor
400x řed.	neředěno
0,23	
0,28	
0,21	0,29-0,28-0,22

lg M

sérum	likvor
400x řed.	neředěno
0,27	0,21
0,32	0,21
0,28	0,19

sérum	likvor
400x řed.	neředěno
0,29	
0,33	
0,40	0,34

Neurofilamenta - 160 000

(absorbance)
negativní kontroly
24-Jedličková
30-Motl
62-Kopecská

lg G

sérum	likvor
400x řed.	neředěno
0,28	0,38
0,31	0,36
0,25	0,35

pozitivní kontroly
X1-Maršíková
X2-Pavel
X3-Folbrechtová

sérum	likvor
400x řed.	neředěno
0,25	
0,24	
0,23	0,38

lg M

sérum	likvor
400x řed.	neředěno
0,41	0,35
0,36	0,29
0,26	0,33

sérum	likvor
400x řed.	neředěno
0,36	
0,35	
0,29	0,23

17 Seznam použitých zkratek

AD	Alzheimerova choroba
anti-NF	protilátky proti neurofilamentům
APP	amyloidový prekurzorový protein
BAEP	sluchové evokované potenciály
CD	pacienti s různými neurologickými chorobami
CDEG	pacienti s neurodegenerativními chorobami
CIS	klinicky izolovaný syndrom
CN	normální kontrolní jedinci
CNS	centrální nervový systém
EDSS	Kurtzkeho škála invalidity (Expanded Disability Status Scale)
ELISA	imunotest na pevné fázi s enzymatickým štěpením substrátu
HPLC	kapalinová chromatografie
Ig M,G	imunoglobuliny M,G
MAG	protein asociovaný s mydlinek
MAPs	proteiny asociované s mikrotubuly
MBP	myelinový bazický protein
MEP	motorické evokované potenciály
MMM	mozkomíšní mok
MOG	myelinový oligodendrocytární glykoproteid
MR	magnetická rezonance
MRZ	přítomnost protilátek proti viru spalniček, zarděnek a varicella-zoster současně
MS	roztroušená skleróza
MSSS	míra progresu invalidity (Multiple Sclerosis Severity Score)
NF	neurofilamenta
NFH	těžká podjednotka neurofilamentového tripletu
NFL	lehká podjednotka neurofilamentového tripletu

NFM	středně těžká podjednotka neurofilamentového tripletu
NK	zvláštní druh buněk tzv. přirození zabíječi (natural killers)
PLP	proteolipidový protein
PP	primárně progresivní forma roztroušené sklerózy
RIA	radioimunotest
RR	relaps-remitující forma roztroušené sklerózy
RS	roztroušená skleróza
SDS-PAGE	polyakrylamidový gel se sodným dodecylsulfátem
SEP	somatosenzorické evokované potenciály
SP	sekundárně progresivní forma roztroušené sklerózy
VEP	zrakové evokované potenciály

18 Seznam publikací autora

(Nejvýznamnější publikace jsou zvýrazněny tučně)

1998

1. **Bartoš Aleš, Vyšata Oldřich. *Wernickeova encefalopatie - opomíjená diagnóza léčitelného onemocnění. Čes. a slov. Neurol. Neurochir. 1998;61/94:135-43.***

V roce 1999 byla této práci udělena Hennerova cena České neurologické společnosti ČLS J.E.P. pro mladé neurology jako nejlepší publikace v kategorii prací z klinické praxe a kazuistik mezi publikacemi roku 1998.

2. Vyšata Oldřich, Titman Otakar, Bartoš Aleš. *Deterministický chaos v biologických neuronových sítích jako model epileptické elektrogenese a paměti. Čes. a slov. Neurol. Neurochir. 1998;61/94:59-63.*

1999

1. Bartoš Aleš. *Diferenciální diagnostika demencí pomocí SPECT vyšetření. Abstrakt. 27. Šerclovy dny, Harrachov. 1999.*
2. Bartoš Aleš, Šach Josef. *Gliomatosis cerebri - stále zrádná diagnóza. Abstrakt. XIV. Česko-slovenské dny mladých neurologů a VIII. Dny mladých neurologů moravskoslezského regionu, Hradec nad Moravicí, okr. Opava. 1999.*
3. Bartoš Aleš, Piňha Jiří. *Roztroušená skleróza a těhotenství. Abstrakt Neuro-ski, Harrachov. 1999.*
4. Bartoš Aleš. *Syndrom opsoklonus - myoklonus - desekvilibrium. Atestační práce 1999;1-41.*

2000

1. Bartoš Aleš, Rusina Robert. *Centrální pontinní myelinolýza v klinicko - neuroanatomických souvislostech. Čes. a slov. Neurol. Neurochir. 2000;63/96:422-5.*
2. Bartoš Aleš, Šach Josef, Janoušková Ladislava, Jirásek Adam. *Gliomatóza mozku - stále zrádná diagnóza. Čes. a slov. Neurol. Neurochir. 2000;63/96:185-8.*
3. Bartoš Aleš, Rusina Robert. *Vitaminem proti demenci ? Abstrakt Neuro-ski, Harrachov. 2000.*
4. Bartoš Aleš, Rusina Robert. *Central pontine myelinolysis -*

5. Bartoš Aleš, Šach Josef. *Gliomatosis cerebri - still a treacherous diagnosis*. Abstract of the 5th EFNS Congress, Copenhagen. European Journal of Neurology 2000;7 (Suppl. 3):96.
6. Bartoš Aleš, Kalvach Pavel . *Neurological postgraduate education in the Czech Republic*. Abstract of the 5th EFNS Congress, Copenhagen. European Journal of Neurology 2000;7 (Suppl. 3):104.
7. Bartoš Aleš, Rusina Robert, Kalvach Pavel. *Vaskulární demence*. Diagnóza 2000;3:8-9.
8. Bartoš Aleš, Rusina Robert, Píchová Renata, Lang Otto, Tošnerová Tamara. *Demence v obraze SPECT vyšetření mozku*. Prak Lékař 2000; č. 11 : 610-613.
9. Medová Eva, Bartoš Aleš, Šach Josef. *Nezvyklá příčina rychle progredující demence*. Abstrakt Neuro-ski, Harrachov. 2000.
10. Topinková Eva, Bartoš Aleš. *Diferenciální diagnostika kognitivních poruch vyššího věku v klinické praxi*. Postgraduální medicína 2000;6:709-16.
11. Tošnerová Tamara, Horáčková M, Bělinová J, Bartoš A, Javůrková A, Bahbouh R, Černý P, Sedláková M, Ambulance pro poruchy paměti. *Problematika poruch paměti v ambulanci praktického lékaře*. Causa subita 2000;27-9.
12. Vyšata Oldřich, Mocková Martina, Bartoš Aleš. *Vyšetření autoprotilátek u zánětlivých polyneuropatií*. Čes. a slov. Neurol. Neurochir. 2000, 63/96(2), 121.

2001

1. A. Bartoš. *Syndrom opsoklonus-myoklonus-dysekvilibrium : případ parainfekční encefalitidy s vzácnou symptomatologií*. Čes. a slov. Neurol. Neurochir. 2001; 64/96: 250
2. **Topinková Eva, Jiráček Roman, Bartoš Aleš. Diferenciální diagnostika kognitivních poruch ve vyšším věku. Doporučený postup pro praktického lékaře.**
<http://www.cls.cz/dp/2002/t271.rtf>
3. A. Bartoš, M. Trost, C. Ertsey, K. Rejdak, L. Popov, G. Kuchukhidze, L. Iutimovschi, L.V. Shalkevich, D. Kadojic, C.H. Tiu, A. Liigant, M. Kapisyzi, R. Jaroščák, and P. Kalvach. *Postgraduate Education in Central and Eastern Europe: Strong and Weak Points*. Journal of the Neurological Sciences 2001; 187, Suppl. 1: 154

4. A. Bartoš, P. Kalvach, M. Trošt, C. Ertsey, K. Rejdak, L. Popov, L. Iuhtimovschi, and *Postgraduate Education in Neurology Group at the first European Cooperation Neurology Workshop*. *Postgraduate Education in Neurology in Central and Eastern Europe*. *Eur J Neurol* 2001; 8: 551-558. IF=1,358
5. A. Bartoš. *Opsoclonus-myoclonus-dysequilibrium syndrome : CSF dynamics in two patients with no steroid response, but successful clonazepam treatment*. *Journal of the Neurological Sciences* 2001; 187, Suppl. 1: 494
6. J. Jeřábek, R. Černý, A. Bartoš, M. Bojar, L. Glosová, J. Zámečník. *Prolonged and Fatal Opsoclonus-Myoclonus-Dysequilibrium Syndrome Associated with Malignant Fibrous Histiocytoma*. *Journal of the Neurological Sciences* 2001; 187, Suppl. 1: 448

2002

1. Bartoš A., Šťourač P., Rusina R., Švejdová M., Velenská Z. *Paraneoplastische Degeneration des Kleinhirns bei einem Ovarialkarzinom: anti-Yo positive Immunreaktivität der Kleinhirn- und Tumorzellen*. *Nervenarzt* 2002; 73 : 995-998. IF 0,886

V roce 2003 byla tato práce vybrána a oceněna Hennerovou cenou České neurologické společnosti ČLS J.E.P. pro mladé neurology jako nejlepší publikace v kategorii prací z klinické praxe a kazuistik mezi publikacemi roku 2002.

2. Bartoš A. *Vascular dementia*. 2002, Prague, <http://neuroacta.cz/4/vascular dementia.html>
3. Bartoš A., Rozsypal H., Machová H. *Meningitidy a encefalitidy*. *Causa subita* 2002; 5 : 332-333
4. Bartoš A., Zimová D., Piřha J. Medová E. *4-year clinical experience with interferon beta 1b in relapsing-remitting multiple sclerosis patients*. *European Journal of Neurology* 2002; 9, Suppl. 2 : 223
5. Rusina R., Bartoš A. *Léčebné ovlivnění demencí*. *Causa subita* 2002; 5 : 428-429
6. Kalvach P, Bartoš A, Dohnalová M, Rejdak K, Herzig R. : From European Cooperation Workshops to the EFNS Academy for Young Neurologists. A handout for YNT meeting in EFNS Congress in Vienna, October 2002

2003

1. Bartoš A, Kompelentová L. *Spondylodiscitida – známá – neznámá?*. Praktický lékař 2003; 83 (2): 85-87
2. Bartoš A, Hájek M, Kalvach P. *Opsoclonus-myoclonus syndrome: Magnetic resonance spectroscopy experience*. European Journal of Neurology 2003; 10, Suppl. 1 : 95-96
3. Bartoš A. *Diferenciální diagnostika krátkodobých poruch vědomí*. Causa subita 2003; 6 (10): 466-468
4. **Bartoš A, Piňha J. *Opsoclonus - myoclonus - dysequilibrium syndrome: cytological and immunological dynamics in the serial cerebrospinal fluid in two patients*. J Neurol 2003; 60 (250): 1420-1425. IF=2,8**

V roce 2004 byla tato práce vybrána a oceněna Hennerovou cenou České neurologické společnosti ČLS J.E.P. pro mladé neurology jako nejlepší publikace v kategorii prací z klinické praxe a kazuistik mezi publikacemi roku 2003.

2004

1. Bartoš A, Piňha J. *Roztroušená skleróza*. Causa Subita 2004; 7(2): 41-43
2. Bartoš A. *Co má mozeček a vaječníky společného...* Vita nostra revue 2004; 13(1): 44-45
3. Bartoš A, Mazancová M, Filip M. *Short screening tests for cognitive status in the primary care practice*. Book of abstracts of the 14th conference Alzheimer Europe, Prague, 2004, p. 52
4. Bartoš A, Dostál V, Hort J, Línek V, Rössner P, Rusina R, Váně T. *Managing dementia in the Czech Republic - therapeutic and organizational issues*. Book of abstracts of the 14th conference Alzheimer Europe, Prague, 2004, p. 48-49
5. Zámečník J, Černý R, Bartoš A, Jeřábek J, Bojar M. *Paraneoplastic opsoclonus-myoclonus syndrome associated with malignant fibrous histiocytoma: neuropathological findings*. Česko-slovenská patologie a soudní lékařství 2004; 40/49 (3): 63-67
6. Bartoš A. *Biochemické ukazatele Alzheimerovy nemoci*. Česká psychiatrie a svět. Sborník přednášek a abstrakt V. sjezdu České psychiatrické společnosti s mezinárodní účastí, Galén, 2004: 5-6
7. **Bartoš A, Fialová L, Soukupová J, Kožený J, Malbohan I. M.**

Výbor Evropské federace neurologických společností při posuzování 158 abstraktů přihlášených mladými evropskými neurology do 35 let na 8. výroční kongres v Paříži vyhodnotil tuto práci jako jednu z 12 nejlepších. Práce byla přednášena na kongresu anglicky v soutěži před komisí.

8. Lang O, Píchová R, Bartoš A, Balon R, Helm R, Kukul J. *Fractal analysis of transverse slices of brain SPECT can differentiate normal and abnormal pattern of brain perfusion.* 51st Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, Philadelphia Pennsylvania Journal of Nuclear Medicine 2004; 45 (5) Suppl: 395
9. Bartoš A. *Teri L, Gibbons LE, McCurry SM et al. Exercise plus behavioral management in patients with Alzheimer's disease.* (Cvičení a zvládnutí poruch chování u pacientů s Alzheimerovou chorobou). Excerptum, Psychiatrie 2004; 8 (2): 169
10. Hončíková M, Šubrtová H, Mociková H, Bartoš A, Salamánková M, Kozák T. *Vyšetření likvoru průtokovou cytometrií.* Sborník abstrakt XVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc, 2.-5.6. 2004, s. 82-83
11. Píchová R, Bartoš A, Lang O, Trojanová H. *Srovnání klinické diagnózy a SPECT perfúze mozku u kognitivních poruch.* Abstrakta 41. dnů nukleární medicíny s mezinárodní účastí, Hradec nad Moravicí, 7.-9.10. 2004 , s. 38
12. Pavelka A, Píchová R, Bartoš A, Kukul J. *Vývoj Alzheimerovy demence z pohledu fraktální analýzy.* Abstrakta 41. dnů nukleární medicíny s mezinárodní účastí, Hradec nad Moravicí, 7.-9.10. 2004 , s. 39
13. Bartoš A, Piňha J. *Axonální patologie v časných stádiích roztroušené sklerózy.* Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie 2004; 67/100 (5): 381
14. **Rusina R, Seemanová E, Lukáš Z, Vyšata O, Bartoš A. *Případ geneticky prokázané okulofaryngeální svalové dystrofie.* Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie 2004; 67/100 (5): 377-379**

V roce 2005 byla tato práce vybrána a oceněna Hennerovou cenou České neurologické společnosti ČLS J.E.P. pro mladé neurology jako nejlepší publikace v kategorii prací z klinické praxe a kazuistik

mezi publikacemi roku 2004.

15. **Bartoš A, Bakalář B, Praško J, Švanda J. *Diagnostika poruch vědomí v klinické praxi*. Karolinum, Praha, 2004: 238 stran**
16. Bartoš A, Fialová L, Soukupová J, Malbohan I, Kožený J. M. *Sérové a mozkomíšní anti-neurofilamentové protilátky u pacientů s roztroušenou sklerózou*. Neurologie pro praxi. Abstrakta 19. českého a slovenského neurologického sjezdu, Brno, 1.-4. 12. 2004, s. 78
17. Bartoš A, Píchová R, Lang O. *SPECT mozku u kognitivních poruch*. Neurologie pro praxi. Abstrakta 19. českého a slovenského neurologického sjezdu, Brno, 1.-4. 12. 2004, s. 57
18. Kukul J, Bartoš A, Píchová R, Pavelka A. *SPECT mozku u kognitivních poruch*. Neurologie pro praxi. Abstrakta 19. českého a slovenského neurologického sjezdu, Brno, 1.-4. 12. 2004, s. 63
19. Bartoš A. Recenze knihy M. Mumenthaler, H. Mattle s překladem E. Taub: *Neurology*. 4th opravené a rozšířené vydání. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2004, Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie 2004; 67/100 (6): 444
20. Bartoš A. *Zpráva o kurzu „Kognitivní poruchy a demence“ konaném ve dnech 16. – 17. 9. 2004 v Brně*. Neurologie pro praxi 2004; 5 (6): 349
21. **Bartoš A. *A peculiar presentation of ovarian carcinoma: paraneoplastic cerebellar degeneration*. Kapitola do americké knihy *Trends in Ovarian Cancer Research* (Edited by A.P. Bardos), Nova Biomedical Books, New York, 2004**

2005

1. Bartoš A. *Léčba Alzheimerovy choroby inhibitory acetylcholinesterázy*. Causa Subita 2005; 8(3): 106-108
2. Mazancová M, Bartoš A, Filip M, Elbertová Z. *The 7 Minute Screen versus the Mini-Mental State Examination*. Abstractband, 3. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Neurologie, Graz, Rakousko, 21.-23. 4. 2005, s. 8
3. Bartoš A. *Zpráva o kurzu „Demence a parkinsonismus II“ konaném ve dnech 26.-27.5. 2005 v Brně*. Neurologie pro praxi 2005; 5 (6): 179

4. **Jaster JH, Zamecnik J, Bartos A, Dohan FC Jr, Smith TW. *Unexpected sudden death caused by medullary brain lesions involves all age groups and may include 'sudden infant death syndrome' as a subset.* Acta Neuropathol (Berl) 2005; 109: 456-457, IF=2.5**
5. **Jaster JH, Zamecnik J, Bartos A, Smith TW. *Demyelination in the brain as a paraneoplastic disorder: candidates include some cases of multiple sclerosis.* Neuroepidemiology 2005;25:212**
6. Kukul J, Bartoš A. *Statistical properties of ANN output.* Mendel 2005, Sborník příspěvků 11. mezinárodní konference, Technická univerzita Brno, 15.-17.6. 2005, str. 97-101, ISBN 80-214-2961-5
7. Trojanová H, Kukul J, Píchová R, Bartoš A, Lang O. *Statistické zpracování SPECT perfuze mozku u dlouhodobě monitorovaných pacientů s pravděpodobnou demencí Alzheimerova typu - metoda.* Abstrakta 42. dnů nukleární medicíny s mezinárodní účastí, Liberec, 14.-16.9. 2005, s. 57
8. Píchová R, Trojanová H, Lang Otto Bartoš A, Kukul J, Matonohová H. *Statistické zpracování SPECT perfuze mozku u dlouhodobě monitorovaných pacientů s pravděpodobnou demencí Alzheimerova typu.* Abstrakta 42. dnů nukleární medicíny s mezinárodní účastí, Liberec, 14.-16.9. 2005, s. 58
9. Matonohová H, Píchová R, Lang O, Trojanová H, Baierová L, Bartoš A. *Sledování vývoje nemoci u pacientů s pravděpodobnou Alzheimerovou demencí na KNM.* Abstrakta 42. dnů nukleární medicíny s mezinárodní účastí, Liberec, 14.-16.9. 2005, s. 71
10. **Bartoš A, Fialová L, Soukupová J, Kukul J, Malbohan I. M. *Serum and cerebrospinal fluid antibodies against the light subunit of neurofilaments in multiple sclerosis.* European Journal of Neurology 2005; 12, Suppl 2: 14 (zařazeno jako přednáška kongresu)**
11. Bartoš A, Kukul J. *Magnetická rezonance mozku u pacientů s Alzheimerovou chorobou.* Psychiatrie 2005; 9 (Suppl. 3): 39-42
12. Kukul J, Bartoš A, Řípová D, Majerová D. *ANN as subject of statistical testing.* Technical computing – Sborník příspěvků 13. mezinárodní konference, Kongresové centrum ČVUT Praha, 15.11. 2005, str. 64-66
13. Bartoš A, Fialová L, Soukupová J, Kukul J, Malbohan I, Piťha J. *Protilátky proti neurofilamentům jako ukazatelé axonálního poškození u roztroušené sklerózy.* Česká a slovenská neurologie a

2006

1. Hainc L, Bartoš A. *Statistické vlastnosti výstupu umělé neuronové sítě*. Automatizace 2006; 49 (2): 78-81
2. **Bartoš A., Fialová L., Soukupová J, Kukul J, Malbohan I, Piřha J. *Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis*. J Neurol, in press, IF=3.0**
3. **Florian Deisenhammer, Ales Bartos, Robert Egg, Nils Erik Gilhus, Gavin Giovannoni, Sebastian Rauer, Finn Sellebjerg. *EFNS guidelines on routine CSF analysis*. European Journal of Neurology 2006, in press, IF=2.0**
4. Musil L, Bartoš A, Matěj R, Elleder M, Hřebíček M. *Unusual cause of stroke: CADASIL with novel mutation in Czech patient*. Čes a slov Neurol Neurochir 2000, in press
5. Peisker T, Bartoš A. *Mozková žilní trombóza - stále opomíjené onemocnění*. Neurologie pro praxi 2006, v recenzním řízení.
6. Bartoš A., Fialová L., Soukupová J, Kukul J, Malbohan I, Piřha J. *Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients*. Připraveno k odeslání do Multiple Sclerosis, IF=3.0

19 Seznam publikací autora vztahujících se k tématu

1. Bartoš A, Piřha J. *Roztroušená skleróza*. Causa Subita 2004; 7(2): 41-43
2. Bartoš A, Fialová L, Soukupová J, Kožený J, Malbohan I. M. *Anti-neurofilament antibodies as a marker of axonal pathology in multiple sclerosis*. European Journal of Neurology 2004; 11, Suppl 2: 355

Výbor Evropské federace neurologických společností při posuzování 158 abstraktů přihlášených mladými evropskými neurology do 35 let na 8. výroční kongres v Paříži vyhodnotil tuto práci jako jednu z 12 nejlepších. Práce byla přednášena na kongresu anglicky v soutěži před komisí.

3. Bartoš A, Piřha J. *Axonální patologie v časných stádiích roztroušené sklerózy*. Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie 2004; 67/100 (5): 381
4. Bartoš A, Fialová L, Soukupová J, Malbohan I, Kožený J. M. *Sérové a mozkomíšní anti-neurofilamentové protilátky u pacientů s roztroušenou sklerózou*. Neurologie pro praxi. Abstrakta 19. českého a slovenského neurologického sjezdu, Brno, 1.-4. 12. 2004, s. 78
5. Bartoš A, Fialová L, Soukupová J, Kukul J, Malbohan I. M. *Serum and cerebrospinal fluid antibodies against the light subunit of neurofilaments in multiple sclerosis*. European Journal of Neurology 2005; 12, Suppl 2: 14 (zařazeno jako přednáška kongresu)
6. Bartoš A, Fialová L, Soukupová J, Kukul J, Malbohan I, Piřha J. *Protilátky proti neurofilamentům jako ukazatelé axonálního poškození u roztroušené sklerózy*. Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie 2005; 68/101 (6): 427
7. Bartoš A., Fialová L., Soukupová J, Kukul J, Malbohan I, Piřha J. *Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis*. J Neurol, in press, IF=3.0
8. Florian Deisenhammer, Ales Bartos, Robert Egg, Nils Erik Gilhus, Gavin Giovannoni, Sebastian Rauer, Finn Sellebjerg. *EFNS guidelines on routine CSF analysis*. European Journal of Neurology 2006, in press, IF=2.0

9. Bartoš A., Fialová L., Soukupová J, Kukul J, Malbohan I, Piřha J. *Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients*. Připraveno k odeslání do Multiple Sclerosis, IF=3.0

