



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Neurofilamenta u pacientů s roztroušenou sklerózou

Neurofilaments in patients with multiple sclerosis

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Petra Havránková

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Lenka Fialová, CSc.

Kladno 2022

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Havránková** Jméno: **Petra** Osobní číslo: **491590**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Neurofilamenta u pacientů s roztroušenou sklerózou

Název bakalářské práce anglicky:

Neurofilaments in Patients with Multiple Sclerosis

Pokyny pro vypracování:

Roztroušená skleróza (RS) je chronické zánětlivé onemocnění centrálního nervového systému, u kterého dochází k poškození neuronů a axonů. Při diagnostice se využívá různých zobrazovacích metod spolu s klinickým vyšetřením a vyšetřením mozkomíšního moku (MMM). V poslední době se přikládá stále větší význam stanovení nových biomarkerů v MMM a v krvi. Významný přínos představují složky cytoskeletu neuronů, jejichž koncentrace se vyšetřují citlivými imunochemickými metodami. Předmětem bakalářské práce bude v teoretické části podat základní informace o RS se zaměřením na její diagnostiku, zejména na nové možnosti laboratorního vyšetření MMM a krve. Náplní praktické části bude vyhodnocení vybraných neurocytoskeletálních biomarkerů v biologických tekutinách u nemocných s RS a jejich srovnání s kontrolní skupinou. Bakalářská práce se bude zabývat především zhodnocením přínosu stanovení neurocytoskeletálních biomarkerů u nemocných s RS na základě literárních údajů i vlastních analýz.

Seznam doporučené literatury:

- [1] VALIŠ, Martin a Zbyšek PAVELEK, Roztroušená skleróza pro praxi, ed. 2, Maxdorf, 2020, ISBN 978-80-7345-672-6
- [2] PETRŽALKA, M., E. MELUZÍNOVÁ, J. LIBERTÍNOVÁ, J. HANZALOVÁ a P. MARUSÍČ, Biomarkery progresu onemocnění a prognózy u pacientů s roztroušenou sklerózou, online, Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, ed. 2018, ročník 2018, číslo 4, ISSN 1802-4041
- [3] VARHAUG, Kristin N., Øivind TORKILDSEN, Kjell-Morten MYHR a Christian N. VEDELER, Neurofilament Light Chain as a Biomarker in Multiple Sclerosis, doi:10.3389/fneur.20, Frontiers in Neurology, ed. 2019, ročník 10, ISSN 1664-2295

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

MUDr. Lenka Fialová, CSc.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **20.09.2021**

Platnost zadání bakalářské práce: **22.09.2023**

doc. Mgr. Zdeněk Hon, Ph.D.
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
děkan

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Neurofilamenta u pacientů s roztroušenou sklerózou vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 29.04.2022

.....
Jméno autora vč. titulů
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych moc poděkovat mé vedoucí bakalářské práce MUDr. Lence Fialové, CSc. za trpělivost, cenné rady a připomínky při řešení dané problematiky.

ABSTRAKT

Roztroušená skleróza (RS) je závažné autoimunitní onemocnění, při kterém dochází ke vzniku zánětlivých ložisek v centrální nervové soustavě (CNS). V důsledku toho dochází u pacientů k nevratné neurodegeneraci.

Ke stanovení diagnózy RS se využívá magnetická rezonance a vyšetření mozkomíšního moku (MMM) izoelektrickou fokusací. V současné době se odborníci zaměřují na studium nových biomarkerů v MMM a v krvi, které by dobře korelovaly s aktuálním stavem pacienta, a daly se tak využít například ke stanovení prognózy onemocnění a monitorování účinnosti farmakologické léčby. Momentálně nejnadějnějšími biomarkery tohoto typu jsou lehké a těžké řetězce neurofilament (NFL a NFH).

V praktické části byly vyhodnoceny naměřené koncentrace NFL a NFH v MMM a v séru u pacientů s RS ($n = 18$) a kontrolní skupiny ($n = 24$). Stanovení neurofilament byla prováděna metodou ELISA. Byly prokázány signifikantně zvýšené koncentrace NFL ($p < 0,001$) a hraničně zvýšené koncentrace NFH ($p = 0,054$) v MMM u pacientů s RS oproti kontrolní skupině. Korelační koeficient prokázal signifikantní vztah u korelace mezi NFL a NFH v MMM zahrnující celý soubor naměřených koncentrací bez rozlišení na skupiny. Pomocí ROC křivky byly stanoveny hraniční koncentrace pro NFL a NFH v MMM a odpovídající senzitivita a specifita vyšetření. Vyhodnocení ROC křivek ukázalo vyšší přínos vyšetření NFL než NFH.

Klíčová slova

Roztroušená skleróza; neurofilamenta; lehké řetězce neurofilament; těžké řetězce neurofilament; diagnostika RS; mozkomíšní mok; ELISA

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is a serious autoimmune disease, in which inflammatory deposits occur in the central nervous (CNS). As a result, patients experience irreversible neurodegeneration.

Magnetic resonance imaging and cerebrospinal fluid (CSF) examination by isoelectric focusing is used to diagnose MS. Currently, experts are focusing on the study of new biomarkers in CSF and blood, which would correlate well with the current state of the patient, and could be used, for example, to determine the prognosis of MS and to monitor the effectiveness of pharmacological treatment. The most promising biomarkers of this type are light and heavy chains of neurofilaments (NFL and NFH).

In the practical part, the measured concentrations of NFL and NFH in CSF and serum in MS patients ($n = 18$) and control groups ($n = 24$) were evaluated. The determinations of neurofilaments were performed by ELISA test. Significantly increased concentrations of NFL ($p < 0,001$) and marginally increased NFH levels ($p = 0,054$) in CSF were demonstrated in patients with MS compared to the control group. The correlation coefficient showed a significant relationship in the correlation between NFL and NFH in CSF, including all measured concentrations without distinction into groups. The cut-off concentrations for NFL and NFH in CSF and appropriate sensitivity and specificity of the tests were determined using the ROC curve. The evaluation of ROC curves showed a higher benefit of NFL examinations in MS than NFH.

Keywords

Multiple Sclerosis; neurofilaments; neurofilament light chain; neurofilament heavy chain; diagnostics of MS; cerebrospinal fluid; ELISA

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Přehled současného stavu.....	10
2.1	Roztroušená skleróza	10
2.1.1	Etiopatogeneze	11
2.1.2	Klinické příznaky	14
2.1.3	Klasifikace	18
2.1.4	Diagnostika	19
2.1.5	Terapie.....	26
2.2	Cytoskelet	27
2.2.1	Mikrotubuly	27
2.2.2	Mikrofilamenta	29
2.2.3	Intermediární filamenta	30
2.3	Neurofilamenta	31
3	Cíl práce.....	34
4	Metodika.....	35
4.1	Charakteristika souboru	35
4.2	Metody stanovení	36
4.2.1	Princip stanovení NFL.....	36
4.2.2	Princip stanovení NFH.....	37
4.3	Chemikálie a pomůcky	39
4.3.1	Souprava pro NFL.....	39
4.3.2	Souprava pro NFH.....	41

4.4	Postup.....	42
4.4.1	Postup měření NFL.....	42
4.4.2	Postup měření NFH.....	44
4.5	Statistické metody.....	46
5	Výsledky.....	47
5.1	Statistické vyhodnocení.....	47
6	Diskuze.....	60
7	Závěr.....	64
8	Seznam použitých zkratk.....	65
9	Seznam použité literatury.....	67
10	Seznam použitých obrázků.....	73
11	Seznam použitých tabulek.....	75

1 ÚVOD

Roztroušená skleróza (RS) je závažné autoimunitní onemocnění postihující osoby v mladém věku. Příčina rozvoje RS dodnes není zcela známá, faktorů podílejících se na etiopatogenezi je mnoho. V důsledku zánětlivého procesu v centrálním nervovém systému (CNS) dochází k neurodegeneraci projevující se neurologickými obtížemi až úplnou invaliditou. To způsobuje velký zásah do osobního i pracovního života pacientů.

Proto je u tohoto onemocnění naprosto zásadní včasná a přesná diagnostika umožňující brzké zahájení účinné farmakologické léčby značně zpomalující rozvoj RS a s ní spojených obtíží. Diagnóza RS se stanovuje na základě klinického vyšetření, vyšetření mozkomíšního moku (MMM) izoelektrickou fokusací (IEF) a zobrazení CNS pomocí magnetické rezonance (MR).

Po stanovení diagnózy je nutné pacienta nadále sledovat, hlavně z důvodu monitorování účinnosti farmakologické léčby. V tomto směru stále chybí neinvazivní, finančně nenáročný test, který by odrážel aktuální stav pacienta.

Pro tyto účely se jako nadějně jeví lehké a těžké řetězce neurofilament (NFL a NFH), které jsou součástí cytoskeletu neuronů, a při neurodegeneraci se hojně uvolňují extracelulárně. Po provedení rozsáhlých klinických studií mají tyto biomarkery velkou šanci stát se součástí rutinní praxe, a pomoci tak ke zkvalitnění života pacientů s RS. Z toho důvodu se tato práce zaměřuje na stanovování a vyhodnocení koncentrací NFL a NFH v krvi a MMM u pacientů s RS.

2 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

2.1 Roztroušená skleróza

RS poprvé popsal již v roce 1868 francouzský neurolog Jean-Martin Charcot, který ji také pojmenoval. Slovo skleróza v názvu označuje jizvy v bílé hmotě, které zůstávají po vyhojení zánětlivého ložiska a slovo roztroušená značí, že u pacientů vzniká více než jedno takové ložisko [1].

RS je závažné autoimunitní onemocnění, při kterém dochází ke vzniku patologických zánětlivých ložisek v centrálním nervovém systému. Tato ložiska způsobují nevratné neurodegenerativní strukturní změny v oblasti mozku a míchy [1].

Celosvětově trpí touto nemocí 2-3 miliony lidí, prevalence je 50-300 pacientů na 100 000 obyvatel. V České republice je prevalence o něco nižší cca 170 pacientů na 100 000 obyvatel a odhadovaný počet nemocných je roven zhruba 17 000. RS patří mezi chronické nevyléčitelné onemocnění postihující zejména mladé lidi. Nejčastěji bývá diagnostikována u lidí ve věku 20-40 let, v dětském věku a po 50. roce života se RS objevuje jen vzácně. Mnohem častěji se vyskytuje u žen (70 % nemocných) než u mužů, důvod není znám [2; 3; 4].

Nejasné jsou také příčiny vzniku onemocnění. Velký podíl je připisován genetickým faktorům, které mohou ovlivňovat imunitní odpověď daného jedince. Je prokázáno, že zvýšené riziko vzniku RS mají nositelé některých alel HLA systému, z toho důvodu děti, jejichž jeden z rodičů má diagnostikovanou RS, mají vyšší riziko rozvoje tohoto onemocnění. Dalším rizikovým faktorem může být nedostatek slunečního záření a s ním spojené snížené množství aktivního vitamínu D. Bylo totiž prokázáno, že toto onemocnění se vyskytuje častěji u obyvatel žijících na severní polokouli, zatímco v tropickém a subtropickém podnebí je prevalence RS mnohem nižší. Mezi další rizikové

faktory můžeme zařadit virové infekce (například EBV, hepatitida B, spalničky, herpes simplex,..), kouření, nadměrný stres a očkování [2; 3].

I když RS stále patří mezi nevléčitelná onemocnění, můžeme její průběh značně ovlivnit účinnou farmakologickou léčbou. V posledních letech vstoupilo na trh mnoho nových léčebných přípravků ovlivňujících průběh RS nejrůznějšími mechanismy. Výběr léků pro terapii RS je tedy obrovský a stále se rozšiřuje. Z toho důvodu je naprosto zásadní včasná diagnostika této nemoci, a následné brzké zahájení efektivní léčby [5].

2.1.1 Etiopatogeneze RS

Hlavní roli při obraně organismu sehrává náš imunitní systém (IS), který by měl být schopen správně rozpoznat nebezpečné patogeny a spustit proti nim adekvátní imunitní reakci vedoucí k jejich likvidaci. Další neméně důležitou schopností IS je rozpoznávání vlastních buněk a tkání, tzv. schopnost autotolerance. Tak jako u každého systému i zde může dojít k poruše. Poruchám schopnosti autotolerance říkáme autoimunitní onemocnění a řadíme sem i roztroušenou sklerózu [2; 6].

Jednou z hlavních rolí v etiopatogenezi RS hrají T-lymfocyty. T-lymfocyty spolu s B-lymfocyty patří mezi buňky specifické imunity. Předností specifické imunity je imunologická paměť buněk zprostředkovávajících tuto imunitní odpověď [2; 6].

Lymfocyty se tvoří v kostní dřeni (KD), B-lymfocyty zde i dozrávají, zatímco T-lymfocyty maturují v brzlíku (thymu). Hlavní úlohou B-lymfocytů je aktivace a přeměna na plazmatické buňky, jež mají schopnost produkovat polyklonální protilátky. Z toho důvodu je velmi důležité odstranit všechny autoreaktivní B-lymfocyty, což se také děje v KD, a následně i v sekundárních lymfoidních orgánech pomocí regulačních T-lymfocytů. B-lymfocyty se také řadí mezi zdatné antigen prezentující buňky (APC) a buňky produkující cytokiny. Důležitým

místem pro získání autotolerance lymfocytů jsou hluboké krční lymfatické uzliny, které jsou zároveň jakousi křižovatkou při cestě z krevního řečiště do CNS [2; 6; 7].

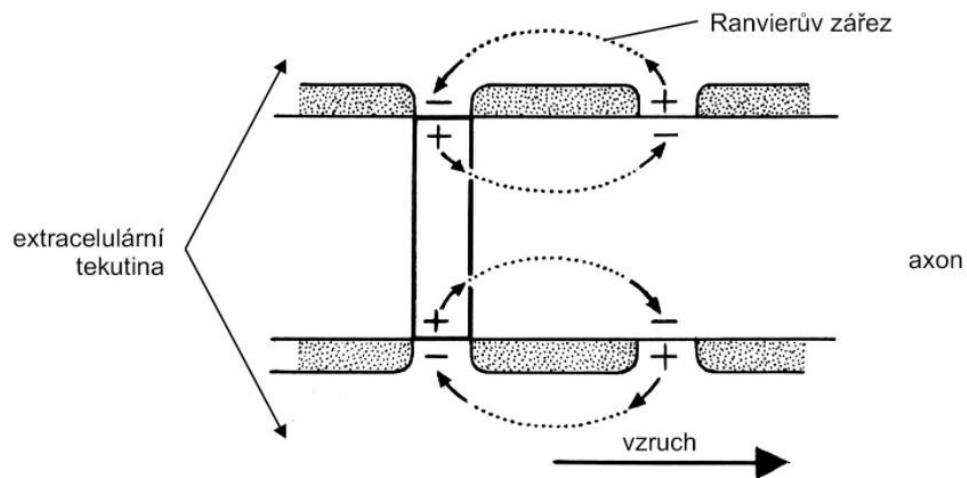
K rozvoji RS dochází narušením autotolerance T-lymfocytů k myelinovým obalům neuronů. K aktivaci lymfocytů dochází v hlubokých krčních lymfatických uzlinách předložením myelinového antigenu APC buňkami, tím dochází ke klonální expanzi lymfocytů a produkci prozánětlivých cytokinů. Příčiny aktivace lymfocytů mohou být různé. Jedním z rizikových faktorů je virová infekce, kdy dochází k poruše autotolerance na základě strukturní podobnosti myelinového bazického proteinu (MBP) s virovými tělisky například EBV viru (tzv. antigenní mimikry) [2; 6; 7].

CNS je chráněna proti buňkám IS hematoencefalickou bariérou (HEB), nicméně i ta je pro aktivované lymfocyty překonatelná. Produkované cytokiny zvyšují výskyt adhezivních molekul, které napomáhají zachycení lymfocytů na HEB, následně se pomocí svých proteolytických enzymů „provrtají“ přes tuto bariéru až k mozkové tkáni. Pokud se aktivovaný lymfocyt dostane až k danému myelinovému antigenu, spustí se silná místní zánětlivá reakce. Porušenou HEB se k mozkové tkáni dostávají i další buňky IS – monocyty, mastocyty, dendritické buňky, NK-buňky, další T a B-lymfocyty aktivně se podílející na rozvoji zánětlivého ložiska. Vlivem této imunitní reakce dochází k poškozování nejen axonů neuronů, ale i oligodendrocytů [2; 6; 7].

Oligodendrocyty jsou specializované buňky CNS, mající schopnost tvořit myelinové pochvy až u dvaceti axonových vláken neuronů najednou, v důsledku poškození ale svou funkci ztrácí, a tak po čase již nedochází k remyelinizaci, nýbrž k jizvení ložiska namnoženými astrocyty. To vede ke vzniku pro RS typických vyhojených zánětlivých ložisek tzv. lézí neboli plaků viditelných na magnetické rezonanci [2; 6; 7].

Z buněk nespecifické imunity se na etiopatogenezi RS významně podílejí monocyty a mikroglie. Monocyty jsou poměrně velké buňky s nesegmentovaným jádrem. Po aktivaci přestupují do tkání a tam se přeměňují na fagocytující makrofágy. Mikroglie jsou specializované buňky v CNS plnící taktéž funkci makrofágů. Mimo jiné makrofágy odstraňují odumřelé tělu vlastní i bakteriální buňky, fungují jako APC, produkují různé interleukiny a tumor nekrotizujícího faktor alfa (TNF- α) [2; 6; 7].

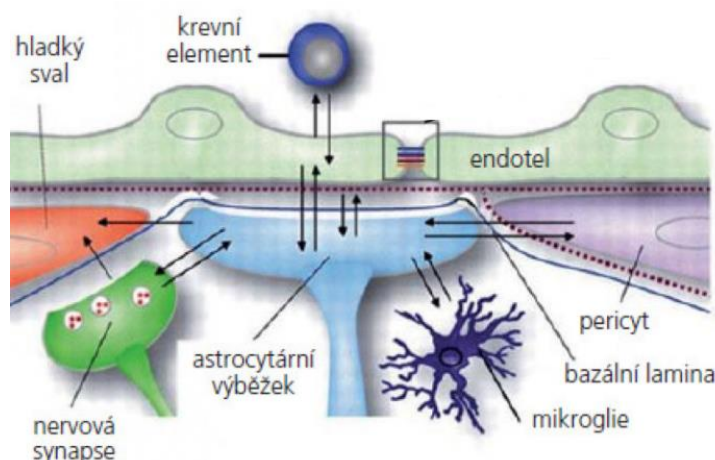
Myelin nemá jen izolační funkci, má velký podíl na šíření vzruchů, zprostředkovává tzv. saltatorní vedení vzruchů (obrázek 1). Myelinizované axony vedou vzruchy až 50x rychleji než axony bez myelinu, proto ztráta myelinu vede k poměrně velkému zpomalení vedení vzruchů. Následkem poškození axonů může být úplné přerušení vedení vzruchů projevující se neurologickými obtížemi až úplnou invaliditou [2; 8].



Obrázek 1 - Saltatorní vedení vzruchů v myelinizovaném nervovém vláknu [8]

CNS a MMM jsou chráněny před nebezpečnými látkami a buňkami IS dvěma bariérami – hematoencefalickou (HEB) a hematolivorovou (HLB). HEB omezuje průnik buněk a látek z krve do mozku. Je tvořena na jedné straně specializovanými endoteliálními buňkami nefenestrovaných krevních kapilár spojenými tzv. těsnými spoji nasedajícími na bazální membránu a na druhé

straně jsou výběžky astrocytů, v jejichž membráně se nachází molekuly akvaporinu-4. Kompletní stavba HEB je znázorněna na obrázku 2 [6; 9; 10].



Obrázek 2 - Stavba hematoencefalické bariéry [10]

Hematolikvorová bariéra je o něco propustnější, omezuje látkovou výměnu mezi krví a MMM. Na jedné straně nacházíme endoteliální buňky fenestrovaných kapilár choroidálních plexů a na straně druhé síť kapilár ependymu mozkových komor. Transportním mechanismem je prostá difuze proteinů ze séra do MMM dle koncentračního gradientu. Z toho důvodu se očekává při vyšší koncentraci bílkovin v séru i jejich zvýšená koncentrace v MMM. Stav HLB se posuzuje na základě albuminového kvocientu. Veškerý albumin pochází totiž výhradně z krve, proto ho lze využít jako ukazatel funkčnosti této bariéry [9; 10; 11].

U RS je typické porušení funkce HEB vedoucí k infiltraci CNS buňkami IS z periferní krve, které se výrazně podílejí na etiopatogenezi tohoto onemocnění. Naopak funkce HLB u RS nebývá porušena [6; 11].

2.1.2 Klinické příznaky RS

Symptomy roztroušené sklerózy jsou velmi různorodé. První projevy bývají dosti nespecifické a jsou často pozorovány i u lidí v mladém věku. Pacienti si často stěžují na únavu, ztrátu energie a hmotnosti, či malátnost. Tyto příznaky se

mohou objevit i několik měsíců před rozvojem typických neurologických symptomů [12].

Neurologické symptomy jsou variabilní, a to v závislosti na postižené oblasti CNS. Některé oblasti bývají postiženy mnohem častěji než jiné, proto lze označit určité neurologické symptomy související s těmito oblastmi za typické pro RS. Nejčastěji nalézáme zánětlivá ložiska v oblasti očního nervu, mozkového kmene, v bílé hmotě komor a v oblasti míchy [13].

U tohoto onemocnění neplatí pravidlo, čím větší zánětlivé ložisko, tím silnější projev onemocnění. Míra postižení závisí primárně na lokalizaci plaků. Může se stát, že pacient s větším poškozením v oblasti bílé hmoty bude bez větších neurologických projevů, zatímco pacient s menším ložiskem v mozkovém kmeni bude mít závažné klinické příznaky, protože zde se nachází motorické či senzorické dráhy [14].

Nejčastějšími neurologickými projevy RS, a často i prvními projevy, bývají poruchy citlivosti. Patří sem parestezie, dysestezie, snížení citlivosti poloviny těla či pouze určitého okrsku těla, mravenčení, pálení, bodání a změny vnímání tepla. Častý je i Lhermittův příznak, který se projevuje brněním při předklonění hlavy. Tyto příznaky jsou často přehlíženy [12; 13].

Druhým nejčastějším příznakem tohoto onemocnění je retrobulbární neuritida (zánět zrakového nervu) projevující se bolestí při pohybu oka a poruchami zraku jako jsou mlhavé vidění, výpadky zorného pole (skotom) a změny barevného vidění. Tyto obtíže nastupují většinou pozvolna v řádu několika hodin či dnů a v rané fázi onemocnění často dochází k jejich spontánní úpravě. Poruchy zraku jsou způsobeny poškozením myelinu optického nervu, čímž se zpomaluje vedení vzruchů. Následně vlivem poškození nervových vláken můžeme pozorovat na optické koherentní tomografii úbytek nervové vrstvy sítnice. Typický pro RS je pouze jednostranný zánět na rozdíl od neuromyelitis optica, kde bývá oboustranný zánět [13].

Po prodělání optické neuritidy zaznamenává oční lékař při vyšetření očního pozadí nablednutí papily zřakového nervu signalizující atrofii. Pacientům se mohou obtíže přechodně vracet, například po horké koupeli nebo fyzické námaze, tomuto jevu říkáme Uhthoffův fenomén [13; 14].

Dalšími symptomy jsou motorické poruchy, které jsou prognosticky horší než poruchy senzitivní. Tyto příznaky se objevují v případě narušení hlavní hybné dráhy, tedy tzv. pyramidové dráhy. Tato dráha končí v předních rozích míchy, kde se přepojuje na periferní nervový systém. Motorické poruchy se projevují slabostí končetin (obrná, paréza), může se jednat o monoparézu (postižení jedné končetiny), hemiparézu (polovina těla) či paraparézu (obě dolní/horní končetiny). Častější jsou poruchy motoriky na dolních končetinách z důvodu delších nervových drah. I po odeznění akutní fáze mohou stále přetrvávat pocity svalového napětí a větší unavitelnosti končetin. V terminálních stádiích často dochází až k úplné ztrátě hybnosti (paraplegie) [12; 13; 14].

Poškození mozečku má též vliv na motoriku, projevuje se poruchou pohybové souhry. Pacienti nemohou trefit cíl (ataxie) a při přibližování k určitému bodu dochází k roztřesení končetiny tzv. mozečkovému třesu. Dále můžeme zaznamenat skandovanou řeč a nejistý stoj [14].

Další jsou sfinkterové poruchy, kam patří problémy s močením i se stolicí. Pacienty trápí zejména častý urgentní pocit na močení, který není závislý na náplni močového měchýře. Dalšími obtížemi jsou inkontinence a nemožnost úplného vyprázdnění močového měchýře. Retence moči vede k častějšímu močení a nebezpečným bakteriálním infekcím. Z hlediska funkce střev je u pacientů s RS nejčastější zácpa, ale může se objevit i velmi sociálně sužující inkontinence stolice [12].

Až 70 % mužů s RS může trpět erektilní dysfunkcí, a to již v raných stádiích onemocnění. Sexuální poruchy nemusí být přímým projevem roztroušené sklerózy, ale mohou se objevit v důsledku únavy, poruchy nálady, zvýšeného

svalového napětí či vlivem užívaných léků. U mužů se mohou dále vyskytovat i poruchy ejakulace. Ztráta libida, snížená citlivost a snížená vlhkost v oblasti pochvy či problémy s dosažením orgasmu se mohou vyskytovat u žen [12; 13].

Dále u pacientů s roztroušenou sklerózou můžeme pozorovat kmenové poruchy. V mozgovém kmeni se nachází dráhy pro hybnost, citlivost, koordinaci pohybu a také jádra mozkových nervů, příznaky tedy mohou být velmi variabilní. Nejčastěji se u pacientů s RS objevují okohybné poruchy – dvojité vidění a nystagmus (mimovolní oční pohyby různého směru), které vznikají vlivem poškození jader mozkových nervů [13].

Typické pro RS jsou i neuropsychiatrické symptomy, které rozdělujeme na emoční poruchy a poruchy kognice. Mezi emoční poruchy patří časté změny nálad, záchvaty nekontrolovatelného pláče nebo smíchu, zvýšená iritabilita úzkost a velmi často i deprese. U deprese je důležité včasné zahájení léčby, v opačném případě může dojít i k sebevraždě. Příčiny vzniku depresí u pacientů s RS jsou dvojího druhu, může jít i o jejich kombinaci. Deprese u pacientů s RS mohou vznikat jako reakce na dlouhodobý stres spojený s nemocí, ale může to být i následek neurologických procesů v CNS [12; 13].

Mezi kognitivní funkce spadají poznávací funkce – paměť a koncentrace, pozornost, řečové funkce, rychlost myšlení a schopnost pochopení informací. Vlivem kognitivních poruch dochází k negativnímu ovlivnění samostatnosti pacientů, někteří kvůli tomu nemohou dál vykonávat své zaměstnání. Tyto poruchy se vyskytují ve všech stádiích onemocnění, nejtěžší jsou však v progresivním stádiu RS [12; 13].

Mezi méně časté symptomy řadíme poruchy řeči – dysartrie (porucha artikulace) a dysfonie (porucha fonace), tremor (třes), dysfagie (porucha polykání), poruchy sluchu a epileptické záchvaty [12].

Symptomů roztroušené sklerózy je mnoho a jsou velmi individuální a variabilní, všechny vznikají v důsledku poškození CNS. Neexistují příznaky specifické pro RS, rozlišujeme pouze projevy typické ve smyslu často se vyskytující a méně časté [12].

2.1.3 Klasifikace RS

V roce 1996 byly americkou National Multiple Sclerosis Society (Národní společnost pro roztroušenou sklerózu) stanoveny čtyři formy/stádia RS, která se používají dodnes v klinické praxi v lehce pozměněné podobě. Kvůli chybějícím objektivním ukazatelům a obtížím při začleňování pacientů do jednotlivých skupin, byla tato kritéria v roce 2013 International Advisory Committee on Clinical Trials of MS upravena [15; 16].

Výsledkem jsou dvě základní skupiny – relabující-remitující RS (RR-RS) a progresivní RS (P-RS). Do skupiny RR-RS je navíc zařazen i klinicky izolovaný syndrom (CIS) popsáný jako stav, kdy pacient má příznaky typické pro demyelinizační onemocnění trvající nejméně 24 hodin. Nástup příznaků byl v řádu hodin či dnů, na magnetické rezonanci (MR) je nález splňující kritéria pro diagnózu RS a v následujících týdnech nastane remise potíží. Je to v podstatě stav, kdy jsou u pacienta zaznamenány první obtíže způsobeny s největší pravděpodobností RS, ale ještě není možné pacienta zařadit do jedné ze skupin popisujících průběh onemocnění. V budoucnu nejčastěji dochází k zařazení pacienta do skupiny lidí s RR-RS formou [15; 16; 17].

RR-RS se vyskytuje na začátku onemocnění až u 85-90 % pacientů. Je pro ni charakteristické střídání neurologických atak a remisí, přičemž jednotlivé ataky mohou trvat několik týdnů až měsíců. Období remise může trvat dokonce i několik let. Neurologická ataka neboli relaps je definován jako přítomnost příznaků typických pro akutní zánětlivou demyelinizační příhodu v CNS trvající nejméně 24 hodin s absencí horečky a infekce. U každé formy RS se navíc po

úpravě v roce 2013 rozlišuje, zda je nebo není aktivní. Aktivitou se rozumí klinická ataka, nebo aktivní či nová, případně zvětšená starší léze viditelná na MR [4; 15; 16; 17].

Progresivní formu RS dělíme na primárně progresivní (PP-RS) a sekundárně progresivní (SP-RS), každá může být aktivní nebo neaktivní. PP-RS se vyznačuje neustálým zhoršováním obtíží bez jakéhokoliv zlepšení či remise, zatímco SP-RS je v podstatě primárně progresivní forma, které předcházela RR-RS. Ke zvratu z RR-RS do SP-RS dochází při vyčerpání regenerační schopnosti oligodendrocytů v CNS. Dělení jednotlivých forem RS na podskupiny je pro přehlednost uvedeno v tabulce 1 [15; 16; 18].

Tabulka 1 - Klasifikace RS [4]

Formy RS	Podskupiny jednotlivých forem RS
Klinický izolovaný syndrom (CIS)	aktivní x neaktivní
Relabující-remitující (RR-RS)	aktivní x neaktivní
Primárně progresivní (PP-RS)	aktivní s progresí x aktivní bez progresu
Sekundárně progresivní (SP-RS)	neaktivní s progresí x neaktivní bez progresu

2.1.4 Diagnostika RS

V současné době stále neexistuje žádný specifický test, který by potvrdil nebo vyvrátil diagnózu RS, proto byla vytvořena tzv. McDonaldova diagnostická kritéria (tabulka 2), která jsou pro lékaře cennou pomůckou. Tato kritéria zohledňují klinický stav pacienta, snímky mozku a míchy pořízené MR a vyšetření MMM. Kritéria byla naposledy revidována v roce 2017, kde byla zdůrazněna důležitost vyšetření oligoklonálních pásů v MMM, jako nedílné součásti pro stanovení definitivní diagnózy RS [4; 14; 15; 19].

Tabulka 2 - McDonaldova diagnostická kritéria revidovaná v roce 2017 [20]

Počet atak (klinické kritérium)	Léze (objektivní průkaz na MR)	Další údaje potřebné ke stanovení diagnózy RS
2 nebo více	objektivní klinický průkaz ≥ 2 lézí nebo objektivní klinický průkaz 1 léze s přijatelným anamnestickým průkazem předchozí ataky	nejsou nutné
2 nebo více	objektivní průkaz 1 léze	průkaz DIS: další atakou nebo novou lézí
1	objektivní průkaz ≥ 2 lézí	průkaz DIT: druhou atakou nebo lézí NEBO průkaz přítomnosti oligoklonálních pásů v MMM
1	objektivní průkaz 1 léze	průkaz DIS: další atakou z jiné lokalizace v CNS nebo lézí na MR a ZÁROVEŇ průkaz DIT: druhou atakou nebo nálezem na MR NEBO přítomnost oligoklonálních pásů v MMM
0		Rok progresu nemoci (retrospektivně nebo prospektivně) a nejméně 2 další kritéria: 1) DIS - mozek: ≥ 1 hyperintenzní léze v jedné nebo více charakteristických lokalitách pro RS 2) DIS – mícha: ≥ 2 h. léze 3) přítomnost oligoklonálních pásů v likvoru (alespoň 2)

DIS – diseminace v prostoru; DIT – diseminace v čase

Vzhledem k absenci specifického testu a variabilitě klinických příznaků je také potřeba vyvrátit všechny ostatní možné diagnózy, tedy provést tzv. diferenciální diagnostiku. Velmi podobné příznaky jako RS má například neuromyelitis optica a choroby jejího širšího spektra (NMOSD), které jsou však snadno odlišitelné od RS pomocí testu na přítomnost protilátek proti akvaporinu 4. Tyto protilátky se běžně vyskytují u neuromyelitis optica, u RS přítomné nejsou [17; 20].

Magnetická rezonance (MR)

Léze u RS jsou popisovány jako T2 hyperintenzní ložiska mající v průměru minimálně 3 mm. Typická místa výskytu jsou rozdělena na 4 oblasti: periventrikulární, juxtakortikální/kortikální, infratentoriální a míšní [15].

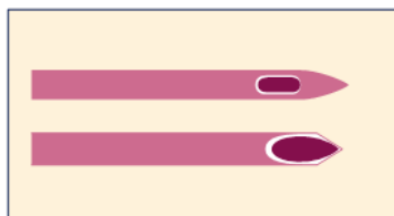
V rámci diagnostických kritérií podle McDonalda se ze snímků z MR posuzuje diseminace v čase a prostoru. O diseminaci v prostoru se jedná tehdy, pokud se na snímcích z MR nachází alespoň po jedné lézi v minimálně dvou různých pro RS typických oblastech. Diseminaci v čase lze prokázat pořízením vícero snímků z MR s časovým odstupem a jejich vzájemným porovnáním, nebo ihned s použitím kontrastní látky, v tomto případě gadolinia. Gadolinium je látka, kterou lze podat nitrožilně v průběhu MR, pomocí níž je možné na snímcích odlišit aktivní – gadolinium enhancující (vychytávající) ložiska od neaktivních – gadolinium neenhancujících (nevychytávajících) ložisek. Průkaz obou typů ložisek na jednom snímku je důkazem diseminace v čase. Pokud na snímku není žádná aktivní léze, pouze neaktivní, je potřeba toto vyšetření za čas zopakovat. Každá nová léze na dalším snímku by byla důkazem diseminace v čase [15; 17; 18].

Vyšetření mozkomíšního moku (MMM)

MMM je čirá, bezbarvá tekutina nepřetržitě produkována buňkami plexus choroideus rychlostí 0,4 ml/min. Denně se vytvoří zhruba 500 ml MMM, ale v těle se udržuje stálé množství 150 ml, MMM je tedy neustále obměňován. MMM cirkuluje v mozkových komorách a malé množství je i v centrálním míšním kanálu. Jeho funkcí je zejména ochrana mozku před nárazy a prudkými pohyby hlavy, ale podíl má také na distribuci neuroendokrinních faktorů a na chemické stabilitě. Významný je i podíl na prevenci mozkové ischemie, kdy v případě intrakraniální hypertenze dochází ke snížení objemu, a tím i k žádoucímu snížení tlaku. Složení MMM je lehce odlišné od složení krevní plazmy. MMM obsahuje

méně bílkovin (0,2-0,45 g/l) a glukózy (2,2-4,2 mmol/l), ale více chloridů (116-130 mmol/l) [21].

MMM se získává ambulantně odběrem z páteřního kanálu z meziobratlového prostoru v bederní oblasti mezi L3/4, L4/5 nebo L5/S1. Pro odběr se používá speciální atraumatická jehla, uvedená na obrázku 3, s otvorem pro MMM po straně a s hrotem ve tvaru tužky. Toto provedení zamezuje vzniku postpunkčních obtíží, vznikajících v důsledku odkapávání MMM po odběru do podkoží. Tím dochází k likvorové hypotenzi projevující se při vertikalizaci pacienta bolestí hlavy, závratí, nauzeou až zvracením. Postpunkční obtíže nemají žádnou souvislost s množstvím odebraného MMM [18; 22].



Obrázek 3 - Srovnání atraumatické punkční jehly (nahore) a klasické punkční jehly (dole) [18]

Mozkomíšního moku odebíráme pouze malé množství, asi 10-15 ml do zkumavky bez fixačního roztoku, protože denaturace bílkovin je z důvodu následujících vyšetření nežádoucí. Nevýhodou je, že buňky poměrně rychle samy degradují, proto je nutné tento materiál zpracovat v laboratoři nejpozději do 2-3 hodin po odběru. Současně (do 30 minut) se provádí i žilní odběr plné srážlivé krve o stejném objemu pro kvantitativní vyšetření. Pro správnou interpretaci výsledků z vyšetření MMM je totiž nutné znát i sérové hodnoty některých analytů [22].

Laboratorní vyšetření MMM se dělí na několik částí. Jako první se posuzuje vzhled MMM před a po centrifugaci. MMM by měl být čirá, bezbarvá tekutina, bez příměsí krve a bez opalescence či zákalu způsobeného hnisavým zánětem. Dále se provádí kvantitativní cytologické vyšetření ve Fuchsově-Rosenthalově

komůrce o objemu 3,2 μl , kde se stanovuje počet jaderných elementů a erytrocytů (pokud jsou ve vzorku přítomny). Pro odlišení mononukleárů od polymorfonukleárů se vzorek barví roztokem fuchsinu a kyseliny octové zvýrazňující jádra a cytoplazmy buněk. Počet erytrocytů se stanovuje vždy v nebarveném vzorku. Při vyšších koncentracích se musí vzorek optimálně naředit. Počet buněk by neměl přesáhnout 4 elementy na 1 μl [23].

Následuje kvantitativní nemorfologické vyšetření v podobě stanovení koncentrace celkové bílkoviny, glukózy a laktátu. Koncentraci celkové bílkoviny lze stanovit přidáním barviva, které se naváže na aromatické aminokyseliny (AMK) a následným proměřením ve fotometru při vlnové délce absorpčního maxima. Další způsob stanovení je přidání precipitačního činidla s následným proměřením v turbidimetru či nefelometru. Na začátku je vhodné pro kontrolu provést orientační Pandyho zkoušku na hodinovém sklíčku, kam se přidávají 2 ml Pandyho činidla a 1 kapka MMM. Poté se hodnotí míra zákalu. Pokud na sklíčku není vidět žádný zákal, předpokládá se normální hladina bílkovin a test je považován za negativní [23].

Glukóza v MMM se stanovuje stejnou metodou jako glukóza v krvi. Využívají se enzymové reakce – hexokinasová nebo glukosaoxidasová. Podobné je to i v případě měření laktátu. To probíhá na principu laktátdehydrogenasové nebo laktáttoxidasové reakce. Z naměřených hodnot pak můžeme vypočítat další parametry, jako například koeficient energetické bilance (KEB) vypovídající o vztahu koncentrace glukózy a laktátu s energetickým metabolismem [23].

Nakonec se provádí kvalitativní cytologické vyšetření MMM za účelem podrobnějšího rozlišení jednotlivých typů buněk, včetně jejich možné aktivace. Vyhodnocení probíhá pod mikroskopem na obarveném trvalém preparátu, připraveném klasickým způsobem, podobně jako preparáty v hematologii. Jedinou zvláštností je, že před přípravou preparátu je nutné vzorek koncentrovat cytosedimentací nebo cytocentrifugací při nízkých otáčkách. Preparáty se barví

standardně podle May-Grünwalda a Giemsy. Případně, pokud máme dostatek MMM, lze zhotovit i další preparáty a obarvit je jednou ze speciálních barvicích metod [22; 24].

V případě RS, v MMM obvykle nacházíme lehkou lymfo-monocytární oligocytózu, aktivované formy monocytů a lymfocytů a pro RS typické plazmatické buňky produkující imunoglobuliny, které jsou zde v hojném počtu. Z nemorfologického vyšetření můžeme odhalit hraniční nebo lehce zvýšenou koncentraci celkové bílkoviny [11].

Kromě rutinního vyšetření MMM a séra, je nutné pro potvrzení diagnózy RS provést test na přítomnost protilátek tvořených v CNS. Intrathekální syntéza protilátek značí přítomnost zánětu v CNS. U RS je možné detekovat intrathekální syntézu protilátek třídy IgG, IgM, IgA i volných řetězců kappa a lambda, nicméně nejčastěji se setkáváme se syntézou protilátek třídy IgG. Tento nález je přítomný až u 95 % pacientů s RS [11; 15; 25].

Intrathekální syntézu můžeme prokázat kvantitativně nebo kvalitativně pomocí průkazu oligoklonálních IgG pásů izoelektrickou fokusací. Pro kvantitativní hodnocení slouží například Reiberův vztah vyjadřující vztah mezi kvocientem albuminu a kvocientem IgG protilátek. Lze ho vyjádřit graficky formou diagramu. Další způsob kvantitativního hodnocení je výpočet IgG indexu, který je dán podílem IgG kvocientu a albuminového kvocientu. O intrathekální syntézu se jedná v případě, že je index IgG vyšší než 0,7. Tento způsob stanovení je sice poměrně jednoduchý, ale také mnohdy nepřesný až nespolehlivý, proto se v klinické praxi rutinně využívá, při podezření na RS, spíše metoda kvalitativního stanovení oligoklonálních IgG pásů pomocí izoelektrické fokusace (IEF) [11; 25].

IEF je elektroforéza na agarosovém gelu, která využívá pro separaci imunoglobulinů gradient pH, čímž dochází k rozdělení bílkovinných frakcí podle jejich izoelektrických bodů (pI). Námi hledané monoklonální IgG

protilátky mají pl v alkalické oblasti elektroforetického pole. Po rozdělení se jednotlivé frakce IgG detekují přímo v gelu navázáním specifické protilátky značené enzymem, nebo se provádí imunoblotting s následným značením specifickou protilátkou, čímž dojde k vyloučení falešně pozitivních nálezů. Toto stanovení je nutné provést v MMM a zároveň i v pacientově séru. Pozitivním výsledkem je nález alespoň dvou oligoklonálních pásů v MMM bez přítomnosti v séru. Příklad pozitivního nálezu je vidět na obrázku 4 [11; 25].



Obrázek 4 - Oligoklonální pásy v MMM bez přítomnosti v séru [18]

V současné době se studie zaměřují na testování vhodných biomarkerů detekovaných v MMM, nebo ještě lépe v séru pacienta, které by dokázaly predikovat průběh RS, a pomohly tak lékařům s výběrem vhodné farmakologické terapie. Dalším přínosem těchto biomarkerů by mohlo být jejich využití pro monitorování úspěšnosti této terapie. Nejnadějnějším biomarkerem pro pacienty, s již stanovenou diagnózou RS, jsou NFL, jejichž hladiny v séru dobře odrážejí stupeň neurodegenerace. Dalšími studovanými biomarkery v souvislosti s RS jsou NFH a chitinase 3-like 1 proteiny. Neurofilamenta jsou hlavním předmětem praktické části této BP, proto budou v další kapitole popsána podrobněji [26; 27].

Zrakové evokované potenciály (VEP)

Měření zrakových evokovaných potenciálů (VEP) je v dnešní době spíše doplňkové vyšetření před stanovením definitivní diagnózy RS, protože mnohem více o stavu pacienta vypovídají snímky z MR. Principem měření zrakových evokovaných potenciálů je sledování elektrické aktivity (el. napětí) mozku pomocí elektrod připevněných na hlavě pacienta po zrakovém stimulu. Vždy se

měří každé oko zvlášť a výsledkem jsou dva grafy, kde se sledují jednotlivé amplitudy (evokované potenciály) v závislosti na čase. Klíčovou amplitudou je vlna P100, která by se měla objevovat cca po 100 ms. Když se tato vlna neobjeví nebo se objeví se zpožděním, je to důkaz zpomaleného přenosu impulzů přes optický nerv způsobený demyelinizací v této oblasti. Zmenšení amplitudy P100 značí dysfunkci axonů. Pro RS je typickým příznakem jednostranný zánět očního nervu, který je tímto vyšetřením prokazatelný [13; 15].

Podobně jako metodou měření VEP lze pozorovat patologické změny na sítnici a optickém nervu pomocí zobrazovací metody zvané optická koherenční tomografie (OCT), kterou je možné využít pro monitorování progresu RS [15].

2.1.5 Terapie RS

Terapii RS můžeme rozdělit na imunomodulační a symptomatickou. Mezi časté symptomy výrazně snižující kvalitu života u pacientů s RS patří únava, kognitivní poruchy, sfinkterové poruchy, spasticita, psychické změny a poruchy chůze. Léčba těchto příznaků může být zahájena v kterémkoliv stádiu onemocnění. Symptomatickou terapií je myšlená cílená farmakologická léčba, která bývá doplněna o režimová opatření a o podpůrnou léčbu [20; 28].

Imunomodulační farmakologickou terapii je nutné zahájit co nejdříve. Před zahájením terapie se nejprve musí stanovit stádium RS, a na základě toho se posléze vybírá vhodný lék z dané skupiny. Na výběr je hned z několika léků s různým mechanismem účinku. Na začátku onemocnění se zpravidla nasazuje některý z léků 1. linie, kam patří například interferon β , teriflunomid, glatiramer acetát či dimethyl fumarát. Začátkem onemocnění je v tomto případě prokázána RR-RS s vysokou aktivitou nebo silná demyelinizační příhoda, u které bylo nutné podat intravenózně kortikosteroidy ve vysoké dávce pacientovi s dosud neprokázanou RS, ale s vyloučenými jinými chorobami a vysokým rizikem, že RS bude brzy prokázána. Při výběru léku z dané skupiny se mimo jiné

zohledňuje i věk, pohlaví pacienta, těhotenství, kojení a další faktory. Při výskytu vedlejších účinků je možné lék vyměnit za jiný lék ze stejné skupiny [20; 28; 29].

V případě zhoršení stavu či nedostatečné účinnosti léčby se nasazuje lék z 2. linie, sem patří například natalizumab, ocrelizumab či fingolimod. Pro další stádia RS je nabídka léků značně omezená z důvodu nízké odpovědi na jakoukoliv léčbu. V progresivním stádiu onemocnění totiž ubývá zánětu a převládá neurodegenerace. V SP-RS stádiu s aktivitou je možné nasadit pouze nový lék s názvem siponimod, který je v současné době jediným lékem účinným v tomto stádiu onemocnění. Jeho hlavním účinkem je snížení hladiny lymfocytů v periferní krvi [16; 20].

Imunomodulační léčba se ukončuje až tehdy, pokud se pacient dostane do SP-RS stádia a v tzv. Kurtzkeho stupnici postižení (EDSS - Expanded Disability Status Scale) přesáhne hodnotu 6,5 [20].

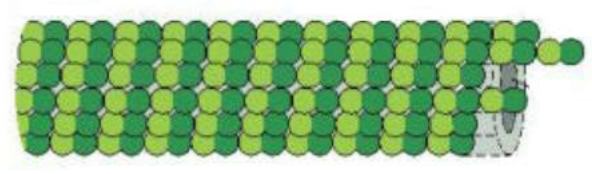
2.2 Cytoskelet

Cytoskelet je důležitou organelou všech eukaryotických buněk. Podílí se na jejich pohybu, pohybu organel, cytoplazmatickém transportu, dělení a tvoří opěrnou prostorovou síť. Mezi prvky cytoskeletu řadíme mikrotubuly, mikrofilamenta a intermediární filamenta (IF) lišící se od sebe strukturou a průměrem. Jsou to vláknité, velmi pohyblivé struktury, které jsou zakotveny na vnitřní ploše cytoplazmatické membrány [30; 31].

2.2.1 Mikrotubuly

Mikrotubuly mají podobu různě dlouhých dutých vláken s průměrem 25 nm. Stěny jsou tvořeny molekulami globulárního proteinu tubulinu, přičemž každá molekula je tvořena ze dvou podjednotek tzv. α -tubulinu a β -tubulinu vytvářejících heterodimery. Longitudinální polymerizací heterodimerů vzniká protofilamentum, na němž můžeme rozlišovat (+)konec a (-)konec. Stěna

mikrotubulu je tvořena celkem třinácti protofilamenty obtáčejícími dutinu (viz obrázek 5) [30; 32].



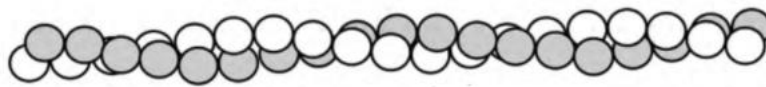
Obrázek 5 – Mikrotubulus [33]

Mikrotubuly se vyznačují velkou labilitou, neustále dochází k odbourávání na (-)konci a přidávání heterodimerů na volný (+)konec mikrotubulu. Prodlužování je řízeno z tzv. mikrotubuly organizujícího centra (MTOC) napojeného na (-)konec. Na mikrotubuly se dále připojují proteiny označované MAPs, jedná se o zkratku z anglického Microtubule Associated Proteins v překladu proteiny asociované s mikrotubuly. Tyto proteiny vlákno stabilizují – strukturální MAPs, jiné zprostředkovávají transport – motorické MAPs (např. kinesin a cytoplazmatický dynein) [30; 32].

Z mikrotubulů jsou tvořeny řasinky a bičíky umožňující buněčný pohyb, dále centriol, centrozom a dělicí vřetenko podílející se na dělení buňky. V neuronech se mikrotubuly vyskytují zejména ve výběžcích (axony, dendrity), kde mají vliv na udržování tvaru buňky. Také zde zprostředkovávají transport látek mezi tělem a výběžky [31; 32; 33].

2.2.2 Mikrofilamenta

Mikrofilamenta mají v průměru 5-7 nm. Základní strukturální jednotkou jsou molekuly globulárního proteinu G-aktinu, které mohou polymerizací vytvářet vlákna tzv. F-aktinu. Dvojitě šroubovici F-aktinu říkáme mikrofilamentum, jeho struktura je znázorněna na obrázku 6. Uspořádání aktinu se liší ve svalových a nesvalových buňkách. Stejně jako mikrotubuly jsou i tyto struktury polární (mají (+) a (-)konec) [30].



Obrázek 6 – Mikrofilamentum [30]

Ve svalových buňkách je aktin pouze v polymerizované formě vytvářející tenká myofilamenta asociovaná s proteinem zvaným tropomyosin, který je stabilizuje a propojuje s tlustými myosinovými vlákny. Tento komplex umožňuje pohyb. V nesvalových buňkách plní aktin funkci cytoskeletu, vyskytuje se v nich pouze z 50 % v polymerizované formě a tvoří velmi dynamické struktury. Nachází se v cytoplasmě ve formě prostorové sítě a těsně pod cytoplasmatickou membránou vytváří tzv. terminální síť propojenou s IF. Dále tvoří některé povrchové struktury jako například mikroklky, stereocilie, pseudopodia či lamellipodia. Spojení mikrofilament s cytoplasmatickou membránou zprostředkovávají aktin vázající proteiny, mezi které patří například vinkulin nebo α -aktinin [30; 32].

Mikrofilamenta se tedy podílí na buněčném pohybu, svalové kontrakci, cytoplasmatickém transportu (endocytóza a exocytóza) a na udržování tvaru buněk. V neuronech zejména regulují pohyb molekul v buněčné membráně a zamezují pohybu organel v cytoplasmě [30; 31].

2.2.3 Intermediární filamenta (IF)

IF jsou dlouhé vláknité struktury o průměru 10-12 nm tvořené různými proteiny. Podle proteinů, které je tvoří, dělíme IF do několika tříd. Patří sem:

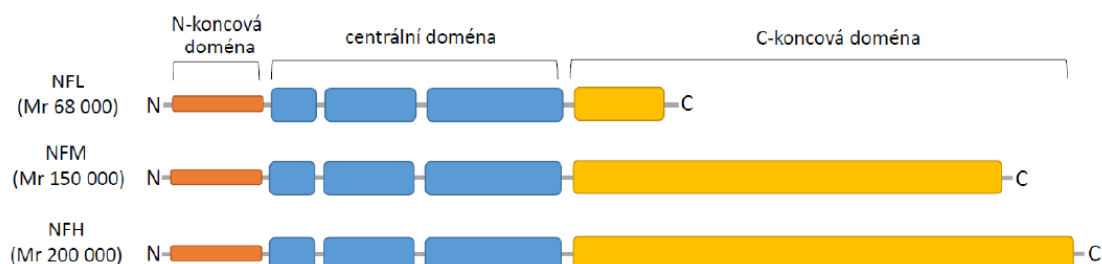
- 1) laminy, které jsou součástí cytoskeletu jádra;
- 2) cytokeratinová IF uložena v epitelových buňkách;
- 3) vimentinová IF v buňkách mezenchymálního a embryonálního původu;
- 4) desminová IF ve svalových buňkách;
- 5) gliová IF vyskytující se v astrocytech nikoliv v neuronech;
- 6) neurofilamenta, která jsou součástí nervových buněk [30; 32].

IF jsou stabilní struktury vyskytující se v cytoplazmě, jejich hlavní funkcí je ukotvení všech organel a vyztužení buňky [32].

2.3 Neurofilamenta

Neurofilamenta patří mezi IF IV. třídy vyskytující se pouze v tělech a výběžcích neuronů. Jsou tvořena ze tří podjednotek, které dohromady vytváří tzv. neurofilamentový triplet. Jednotlivé podjednotky se rozlišují podle své molekulové velikosti, nejmenší jsou označovány jako lehké řetězce (68 kDa), dalšími jsou střední řetězce (145 kDa) a největší těžké řetězce (200 kDa). Nejvyšší zastoupení mají NFL, které se vyskytují ve všech neurofilamentech spolu s NFH nebo středními řetězci neurofilament (NFM) [34; 35].

Jednotlivé řetězce jsou tvořeny fibrilárními proteiny uspořádanými do centrální šroubovice zakončené globulárními úseky na obou stranách. Na základě různé délky globulárního C-konce označovaného jako ocásek rozlišujeme jednotlivé typy řetězců, N-konec tvoří globulární hlavičku stejně dlouhou pro všechny řetězce. Stavba řetězců je znázorněna na obrázku 7 [35].



Obrázek 7 - Schéma struktury řetězců neurofilament [35]

Kromě řetězců jsou neurofilamenta tvořena i dalšími proteiny, například nestinem nebo α -internexinem. Zajímavým rysem všech řetězců, zejména NFH, je jejich velká míra fosforylace [31; 35].

Hlavní funkcí neurofilament je zpevnění a udržování tvaru neuronů, v případě porušení integrity může dojít k poruše či zpomalení neurotransmise. Dále se podílí i na regulačních procesech [31; 36].

Při poškození axonů dochází k uvolnění lehkých a těžkých řetězců neurofilament do MMM a krve, proto jsou v současné době neurofilamenta

předmětem zájmu mnoha klinických studií. Předpokládá se, že by se stanovování hladiny NFL mohlo stát ukazatelem stupně neurodegenerace u nemocných s RS, demencí, Alzheimerovou chorobou nebo u lidí s jinou neurologickou poruchou [34; 37].

Hladiny NFL a NFH lze stanovit v MMM i v krvi, ale ještě donedávna tomu tak nebylo. Hladiny neurofilament v krvi jsou totiž o tolik nižší než v MMM, že nebylo možné je dostupnými metodami detekovat. Zájem o neurofilamenta vzrostl až po rozvoji citlivých a dostatečně přesných imunoanalytických metod, protože odběr krve je mnohem jednodušší a šetrnější než odběr MMM. Pro stanovení hladin neurofilament v séru slouží ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) nebo mnohem citlivější metoda zvaná SIMOA (single molecule array) [34; 35; 37].

Nejnadějnějším markerem je v tomto směru NFL, díky své nízké molekulové hmotnosti totiž na rozdíl od NFH snáze proniká do MMM. Sledování hladin NFL v krvi by mohly být užitečné i pro sledování účinku terapie u pacientů s RS. Výzkumy odhalily, že při podávání některých léčiv například fingolimodu nebo natalizumabu po dobu několika měsíců se hladiny NFL v séru u pacientů s RS snížily, zatímco při podávání placebo nikoliv. Dalším využitím stanovení hladin neurofilament v séru by mohla být predikce konverze z CIS nebo RIS (radiologicky izolovaného syndromu) do definitivní RS. Zde se ale výsledky studií značně liší. Nicméně s jistotou byla prokázána korelace nálezů na MR s hladinou NFL v séru, což dokazuje možnost odhadovat na základě NFL aktivitu a stádium RS [27; 34; 35; 37; 38].

Do budoucna se očekává, že by se stanovení NFL mohlo stát běžnou součástí klinického vyšetření u pacientů s RS nebo jinými nemocemi s neurodegenerativním charakterem. Pro zavedení je potřeba provést rozsáhlé studie a standardizaci měření. Při hodnocení hladin NFL je zapotřebí brát

v úvahu, že hladinu NFL v MMM, a tím i v krvi zvyšuje nejen stupeň neurodegenerace, ale také věk pacienta [27; 34; 35].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je v teoretické části charakterizovat RS a popsat způsoby diagnostiky tohoto onemocnění se zaměřením na vyšetření MMM. Práce klade důraz i na nové biomarkery v MMM a v séru, které by do budoucna mohly být velkým přínosem pro monitorování aktivity RS a sledování účinnosti její léčby. Dále by mohly hrát důležitou roli i při diagnostice tohoto onemocnění. Z těchto biomarkerů jsou pro klinickou praxi nejnadějnější neurofilamenta, která budou v práci popsána detailněji. Jedná se o specifické složky cytoskeletu neuronů skládající se ze tří typů řetězců – NFL, NFH, NFM, které se při neurodegeneraci uvolňují do extracelulárního prostoru.

Praktická část bude zaměřena na princip a postup měření NFL a NFH v MMM i krevi metodou ELISA. Dále bude provedena vlastní statistická analýza již naměřených koncentrací neurofilament u pacientů s RS a kontrolní skupiny s cílem porovnat koncentrace NFL a NFH mezi skupinami, stanovit pomocí ROC (Receiver Operating Characteristic) křivky hraniční koncentrace NFL a NFH v MMM a zjistit vzájemný vztah mezi NFL či NFH v MMM a věkem a mezi samotnými biomarkery.

Na základě výsledků statistické analýzy bude zhodnocen přínos tohoto vyšetření v praxi.

4 METODIKA

4.1 Charakteristika souboru

Data pro zpracování byla laskavě poskytnuta prof. MUDr. Alešem Bartošem Ph.D. z 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy z jeho širší studie vztahující se k vyšetření neurofilament u pacientů s RS. Studie byla schválena Etickou komisí FN Královské Vinohrady a osoby zařazené do této studie podepsaly informovaný souhlas s účastí ve studii.

Soubor zahrnuje 42 osob, v jejichž likvoru byly vyšetřeny koncentrace NFL a NFH. Soubor byl rozdělen na 2 skupiny – kontrolní skupinu ($n = 24$) a skupinu pacientů s RS ($n = 18$). Do kontrolní skupiny byly vybráni pacienti s heterogenními neurologickými symptomy a nezánettivými onemocněními, kteří podstoupili lumbální punkci jako součást rutinního diagnostického procesu. Do skupiny pacientů s RS bylo zařazeno 18 osob s RR-RS. Diagnostika RS byla provedena zkušeným neurologem na základě kritérií platných v době lumbální punkce [39].

U některých osob byla změřena i koncentrace neurofilament v séru. Celkem byla analýza NFL a NFH v séru provedena u 11 osob z kontrolní skupiny a u 7 pacientů s RS. U jedné osoby z kontrolní skupiny a u 3 pacientů s RS byly koncentrace NFL pod detekčním limitem použité soupravy. Z toho důvodu a z důvodu nízkého počtu vyšetření nebyly sérové koncentrace NFL statisticky vyhodnocovány. V případě NFH byla pouze u 3 pacientů s RS stanovena jejich přesná koncentrace v séru, u zbylých 15 osob se hodnoty koncentrace NFH nacházely pod detekčním limitem použité soupravy. Z toho důvodu nebyly ani sérové koncentrace NFH statisticky zpracovány.

Vyšetřeni byli muži i ženy ve věku 23-50 let. Konkrétní zastoupení mužů a žen v jednotlivých skupinách spolu s průměrným věkem je uvedeno v tabulce 3. Z tabulky vyplývá, že pacienti s RS byly starší ($p = 0,04$).

Tabulka 3 - Demografické údaje souboru

	kontrolní skupina (KS)	skupina s RS (RS)
celkový počet	24	18
průměrný věk (roky)*	34	38
počet žen	17	14
průměrný věk žen (roky)	33	38
počet mužů	7	4
průměrný věk mužů (roky)	36	40

* $p = 0,04$

4.2 Metody stanovení

Pro stanovení hladin neurofilament v MMM a séru byla použita sendvičová ELISA metoda založená na kvantifikaci interakcí antigenu s protilátkou zviditelněných pomocí enzymového značení. Pokud je vyšetřovaným analytem antigen, označujeme tuto metodu jako přímou, měření protilátek je metodou nepřímou. V tomto případě byly měřeny koncentrace antigenů v podobě NFL a NFH, přičemž každý typ řetězce neurofilament byl stanovován zvlášť.

4.2.1 Princip stanovení NFL

Pro stanovení NFL v MMM a séru byla použita NF-light ELISA souprava od firmy UmanDiagnostics (Umeå, Švédsko).

ELISA je hojně využívaná imunochemická metoda, pomocí které lze kvalitativně i kvantitativně stanovit různé antigeny či protilátky.

Imunochemické reakce probíhají v jamkách mikrotitrační destičky, která je součástí ELISA soupravy od daného výrobce. Dna jednotlivých jamek na mikrotitrační destičce jsou potažena myší monoklonální protilátkou proti NFL. Po inkubaci přidaného vzorku MMM nebo séra dochází k navázání všech přítomných NFL na protilátky na dně destičky. Ostatní látky se v následujícím kroku odstraní promytím, aby nedocházelo k interferencím. Jedná se o heterogenní metodu, proto se promývání provádí po každé inkubaci. V případě, že vzorek žádné NFL neobsahuje, nevznikne nám žádný imunokomplex a po dokončení nedojde ke vzniku zbarvení.

Následně se do jamek přidává primární monoklonální protilátka proti NFL značená biotinem, která se váže na zachycený imunokomplex s NFL na dně jamky. Odtud pochází název sendvičová ELISA, protože komplex protilátka-antigen-protilátka připomíná sendvič.

Pro zviditelnění vzniklého imunokomplexu se přidává konjugát složený ze streptavidinu a enzymu křenové peroxidázy. Streptavidin je protein izolovaný z bakterie *Streptomyces avidinii* vyznačující se vysokou afinitou k biotinu, s nímž je schopen tvořit velmi silnou vazbu. Křenová peroxidáza je zodpovědná za přeměnu bezbarvého substrátu na barevný produkt. Celá reakce je po výrobcem určené době zastavena přidáním stop roztoku a intenzita zbarvení se hned poté měří fotometricky při vlnové délce 450 nm.

4.2.2 Princip stanovení NFH

Pro stanovení fosforylovaných NFH v MMM a séru byla použita komerční sendvičová ELISA souprava od společnosti BioVendor (Brno, Česká republika), která je určena pouze pro výzkumné účely.

Princip stanovení je v podstatě stejný jako u měření NFL. I toto vyšetření je založeno na enzymové imunoanalýze. Dna mikrotitračních jamek jsou potažena kuřecími polyklonálními protilátkami proti NFH, na které se navazují NFH ze

vzorku MMM nebo séra. Na zachycené NFH se váže králičí polyklonální protilátka proti NFH označovaná jako primární. Vzniklý imunokomplex je detekován sekundární protilátkou konjugovanou s enzymem křenovou peroxidázou, která má velkou afinitu ke králičí protilátce imunokomplexu. Přidaný substrát reaguje s enzymem za vzniku modrého zbarvení. Reakce je zastavena po určité době přidáním kyselého stop roztoku a hned poté se měří intenzita žlutého zbarvení ve fotometru při 450 nm. Jedná se o heterogenní metodu, proto je nutné mezi jednotlivými kroky jamky promývat.

4.3 Chemikálie a pomůcky

4.3.1 Souprava pro NFL

Součástí NF-light ELISA soupravy je mikrotitrační destička (96 jamek), v níž jsou dna jamek potažena myší monoklonální protilátkou proti NFL, 2 kryty na destičku, 2 Sarstedtovy zkumavky (15 ml) pro přípravu konjugátu a chemikálie uvedené v tabulce 4.

Tabulka 4 - Chemikálie obsažené v NF-light ELISA soupravě a jejich složení

CHEMIKÁLIE	SLOŽENÍ
promývací roztok (10x koncentrovaný)	pufr a detergent
ředící roztok pro konjugát	stabilizační pufr bez biotinu
ředící roztok pro vzorek	pufr a detergent
standardní roztok	bovinní vzorek NFL (od skotu negativního na BSE a FMD)
tracer (50x koncentrovaný)	biotinem značená monoklonální protilátka proti NFL ve stabilizačním pufru bez biotinu
roztok konjugátu	streptavidin s navázanou křenovou peroxidázou ve stabilizačním pufru bez biotinu
substrát	tetramethylbenzidin
stop roztok	ředěná kyselina sírová (8 %)

Kromě chemikálií uvedených v tabulce 4 je potřeba i deionizovaná voda, která stejně jako níže uvedené pomůcky nezbytné pro měření, není součástí námi použité NF-light ELISA soupravy.

Další nezbytné pomůcky pro stanovení NFL:

- ELISA-reader (450 nm)
- automatická nebo polo-automatická mikrotitrační promývačka
- stolní orbitální ELISA třepačka (800 rpm)
- vortex
- mikropipety (10-1000 μ l)
- plastové špičky na mikropipety
- stopky
- polypropylenové mikrozkušavky
- zkumavky
- skleněné nádoby (odměrný válec a uzavíratelná lahev)
- alobalová fólie
- lihový fix

4.3.2 Souprava pro NFH

Součástí soupravy pro stanovení NFH od firmy BioVendor jsou mikrotitrační proužky s celkem 96 jamkami potaženými kuřecími protilátkami proti NFH a chemikálie uvedené v tabulce 5.

Tabulka 5 - Chemikálie obsažené v ELISA soupravě pro měření NFH

CHEMIKÁLIE	SLOŽENÍ
ředící roztok	pufr
promývací roztok (10x koncentrovaný)	složení těchto roztoků není v návodu od výrobce uvedeno
standardní roztok	
kontrolní roztok – vysoká hladina	
kontrolní roztok – nízká hladina	
roztok s detekční protilátkou	králičí polyklonální protilátka proti NFH
roztok konjugátu	protilátka proti primární protilátce značená křenovou peroxidázou
substrát	tetramethylbenzidin
stop roztok	roztok kyseliny

Mimo chemikálie uvedené v tabulce 5 je potřeba i deionizovaná voda a pomůcky uvedené níže, které nejsou součástí použité ELISA soupravy.

Nezbytné pomůcky, které nejsou dodávány spolu se soupravou:

- ELISA-reader (450 nm)
- promývačka na mikrotitrační destičky
- orbitální třepačka mikrodestiček (300 rpm)
- vortex
- software pro analýzu dat
- mikropipety (10-1000 μ l)

- vícekanálová pipeta (100 μ l)
- jednorázové plastové špičky
- mikrozkuhavky
- skleněné nádoby (odměrný válec a uzavíratelná lahev)
- držák na stripy
- absorpční materiál (papírové ubrousky/buničina)
- alobalová fólie
- lihový fix

4.4 Postup

4.4.1 Postup měření NFL

Před začátkem měření je nutné nechat reagentie vytemperovat na pokojovou teplotu 20-25 °C, protože se uchovávají v lednici při teplotě 2-8°C. Také je třeba rozmrazit vzorky MMM nebo sér, které se do vyšetření skladují v mrazáku v polypropylenových mikrozkuhavkách při teplotě -80°C.

Dále se musí 1x naředit promývací roztok (dodáván jako 10x koncentrovaný) deionizovanou vodou na celkový objem 400 ml (40 ml koncentrátu + 360 ml vody).

Těsně před začátkem analýzy se rekonstituuje standard (objem a typ rozpouštědla je uveden na lahvičce), krátce se promíchá na vortexu a nařadí se vzorkovým pufrům do osmi předem označených mikrozkuhovek. Roztoky standardu slouží jako tzv. kalibrační roztoky. Konkrétní objemy standardu a vzorkového pufru pro přípravu kalibrační řady (5000 pg/ml, 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 50 pg/ml, 0 pg/ml) jsou uvedeny v návodu od výrobce soupravy.

Naředit je nutné i vyšetřované vzorky MMM nebo séra, a to v poměru 1:1 se vzorkovým pufrům na minimální výsledný objem 210 μ l. Ředění se provádí vždy do předem označených čistých mikrozkuhovek.

Protože vnitřní kontrola není součástí soupravy, musela být vytvořena smícháním několika vyšetřených patientských vzorků MMM nebo sér se zvýšenou hladinou NFL tak, aby výsledná hladina kontrolního roztoku byla v rozmezí 1000-3000 pg/ml. Poté se kontrolní roztok několikrát proměřil ve fotometru za účelem stanovení přesné koncentrace a povolených odchylek. Z takto připravené vnitřní kontroly se vytvořily do označených mikrozkušavek alikvoty, které se skladují v mrazáku při -80 °C. Před použitím se taktéž musí nechat vytemperovat na pokojovou teplotu.

Samotná enzymová imunoanalýza byla provedena na mikrotitrační destičce o 96 jamkách. Vše se pipetovalo v dubletu a postupovalo se takto:

1. Před začátkem se všechny jamky 3x propláchly promývacím roztokem (přidáním 3x 300 μ l) pomocí polo-automatické promývačky.
2. Do prvních jamek byly napipetovány jednotlivé kalibrační roztoky, kontrolní roztok a do dalších jamek nařaděné vzorky MMM nebo séra, každý o objemu 100 μ l.
3. Následně se destička nechala inkubovat po dobu 60 minut na třepačce (800 rpm) při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby se jamky znovu 3x propláchly promývacím roztokem (3x 300 μ l).
4. Bezprostředně po promytí, se vzorkovým pufrům 1x zředil tracer (dodáván jako 50x koncentrovaný) v poměru 0,2 ml traceru a 9,8 ml pufru do předem označené zkumavky. Takto nařaděného roztoku se přidalo 100 μ l do každé jamky.
5. Poté proběhla 45minutová inkubace na třepačce (800 rpm) při pokojové teplotě a 3x propláchnutí promývacím roztokem (3x 300 μ l).
6. Těsně před nanášením konjugátu je nutné jej 1x naředit speciálním ředícím roztokem pro konjugát do předem označené zkumavky dodané výrobcem soupravy. Objem konjugátu a ředícího roztoku je uveden na

lahvičce konjugátu. Po zředění a pečlivém promíchání se pipetuje 100 μ l konjugátu do každé jamky.

7. Následuje inkubace po dobu 30 minut na třepačce (800 rpm) při pokojové teplotě a 3x propláchnutí promývacím roztokem (3x 300 μ l).
8. Nakonec se do každé jamky přidá 100 μ l substrátu, destička se zakryje alobalovou fólií a nechá se 15 minut inkubovat na třepačce (800 rpm) při pokojové teplotě.
9. Celá reakce se ukončí přidáním 50 μ l stop roztoku do každé jamky.
10. Ihned po skončení se proměří absorbance v ELISA-readeru při vlnové délce 450 nm.

Z naměřených absorbancí kalibračních roztoků a jejich známých koncentrací se pomocí softwaru vytvoří kalibrační přímka, čímž se získá vztah mezi měřenou koncentrací a odezvou přístroje. Na základě toho je možné dopočítat koncentrace NFL v analyzovaných vzorcích.

Detekční limit použité soupravy je 33 pg/ml.

Pro měření absorbance NFL v mikrotitračních jamkách byl použit ELISA-reader SUNRISE od firmy Tecan (Rakousko).

4.4.2 Postup měření NFH

Reagencie v soupravě se uchovávají v lednici při teplotě 2-8 °C, před použitím se musí nechat vytemperovat na pokojovou teplotu. Pokud se vzorky MMM nebo séra nevyšetří ihned po odběru, skladují se v mrazáku při teplotě -80 °C. Před analýzou je třeba vzorky nechat důkladně rozmrazit, pořádně promíchat na vortexu a naředit ředícím pufrům do označených mikrozkušavek v poměru 1:2 na výsledný objem 240 μ l (80 μ l vzorku a 160 μ l ředícího pufru).

Těsně před analýzou je nutné rekonstituovat standard a kontrolní roztoky (nízká a vysoká hladina) ředícím pufrům. Potřebný objem pufru je uveden na originálních lahvičkách. Rozpouštění trvá minimálně 15 minut a občas je dobré

obsah jemně promíchat. Poté následuje příprava kalibračních roztoků do předem nadepsaných mikrozskumavek. Kalibrační roztoky (4000 pg/ml, 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml) se připravují ředěním rozpuštěného standardu ředícím pufrům. Konkrétní objemy standardu a pufru u jednotlivých koncentrací jsou uvedeny v manuálu od výrobce soupravy.

Posledním krokem před samotnou analýzou je naředění promývacího roztoku (dodáván jako 10x koncentrovaný) destilovanou vodou do předem označené uzavíratelné nádoby na 1x koncentrovaný roztok (100 ml koncentrátu a 900 ml destilované vody).

Samotná enzymová imunoanalýza byla provedena na mikrotitračních stripech o celkem 96 jamkách. Vše se pipetovalo v dubletu a postupovalo se takto:

1. Do prvních jamek byly přidány kalibrační roztoky, ředící pufr (blank) a oba kontrolní roztoky, následně i vzorky. Každý o objemu 100 μ l.
2. Poté se stripy nechaly inkubovat 60 minut při pokojové teplotě na stolní třepačce (300 rpm). Po uplynutí této doby se jednotlivé jamky 3x propláchly promývacím roztokem (3 x 350 μ l), nakonec se stripy obrátily a silným poklepáním o stůl pokrytý papírovými ubrousky se odstranily poslední zbytky promývacího roztoku.
3. Do každé jamky se napipetovalo 100 μ l roztoku detekční protilátky.
4. Zopakování bodu 2.
5. Do každé jamky se přidalo 100 μ l konjugátu.
6. Zopakování bodu 2.
7. Do každé jamky se přidalo 100 μ l substrátu, ihned poté se celá destička přikryla alobalovou fólií a takto se nechala stát 15 minut při pokojové teplotě.
8. Nakonec se do každé jamky napipetovalo 100 μ l stop roztoku.
9. Nejpozději do 5 minut od předchozího kroku se proměřily všechny jamky v ELISA-readeru při vlnové délce 450 nm.

Z naměřených absorbancí kalibračních roztoků a jejich známých koncentrací se pomocí softwaru vytvoří kalibrační přímka, čímž se získá vztah mezi měřenou koncentrací a odezvou přístroje. Na základě toho je možné dopočítat koncentrace NFH v analyzovaných vzorcích.

Detekční limit použité soupravy je 23,5 pg/ml.

Pro měření absorpance NFH v mikrotitračních jamkách byl použit ELISA-reader SUNRISE od firmy Tecan (Rakousko).

4.5 Statistické metody

Vzhledem k nižšímu počtu provedených vyšetření a nenormálnímu rozložení naměřených koncentrací NFL a NFH v MMM byly pro statistické zpracování použity neparametrické statistické metody v podobě Mannova-Whitneyova testu pro porovnání skupin a Spearmanova korelačního koeficientu pro korelační analýzy. Normalita dat byla předem ověřena pomocí histogramu a Sharpirova-Wilkova testu.

Hladina významnosti pro všechny testy byla $p < 0,05$.

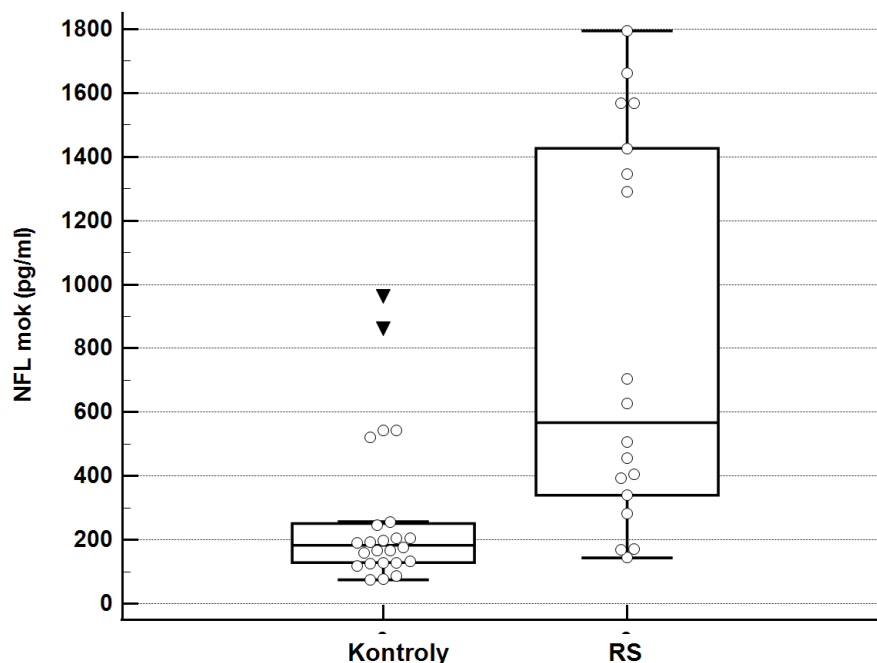
Statistické zpracování naměřených hodnot, analýza ROC křivek a grafy byly provedeny v programu Microsoft Office Excel 365 a MedCalc (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium).

5 VÝSLEDKY

5.1 Statistické vyhodnocení

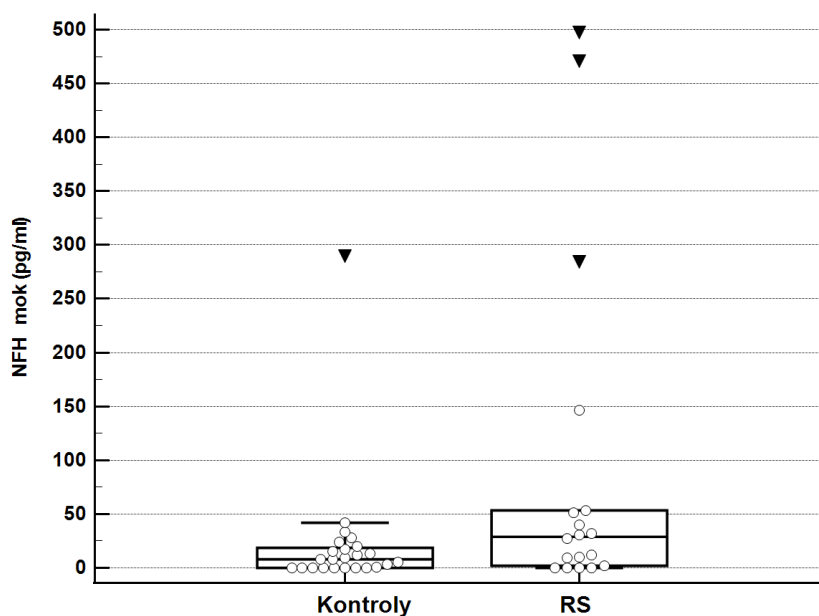
Na následujících obrázcích 8-10 jsou vyobrazeny box-plot grafy koncentrací NFL, NFH a jejich poměru NFL/NFH v MMM. Na každém obrázku jsou vždy dva box-ploty pro porovnání naměřených hodnot u kontrolní skupiny a pacientů s RS. Středový rámeček (box) vymezuje hodnoty od dolního kvartilu (25. percentil) do horního kvartilu (75. percentil), vodorovná čára uvnitř rámečku znázorňuje medián. Kratší vodorovná čára nad a pod rámečkem znázorňuje maximální a minimální hodnotu (s výjimkou vnějších a vzdálených hodnot). Černé trojúhelníky značí hodnoty vzdálené.

V tabulce 6 jsou pak uvedeny hodnoty mediánů a rozmezí pro koncentrace NFL, NFH a poměr koncentrací NFL/NFH.



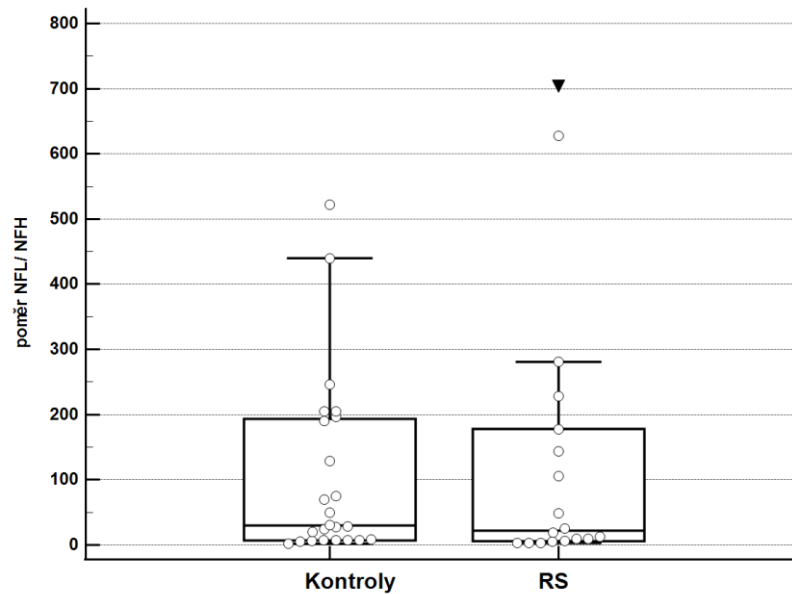
Obrázek 8 - Box-plot graf pro koncentrace NFL v MMM u kontrolní skupiny a pacientů s RS ($p < 0,001$)

Pacienti s RS mají signifikantně vyšší koncentrace NFL než kontrolní skupina ($p < 0,001$). U pacientů s RS lze také pozorovat nápadně větší rozptyl hodnot.



Obrázek 9 - Box-plot graf pro koncentrace NFH v MMM u kontrolní skupiny a pacientů s RS ($p = 0,054$)

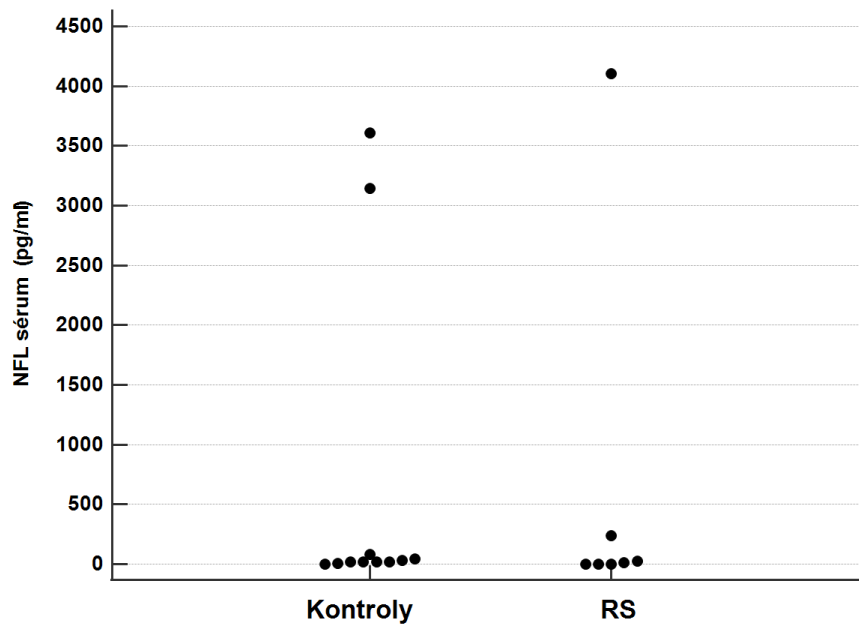
Jednotlivé hodnoty NFH v MMM se pohybují v poměrně úzkém rozmezí, zejména u kontrolní skupiny. Koncentrace NFH v MMM jsou u pacientů s RS zvýšené v porovnání s kontrolní skupinou ($p = 0,054$), ale rozdíly jsou méně vyjádřené než u NFL, jsou na hranici statistické signifikance.



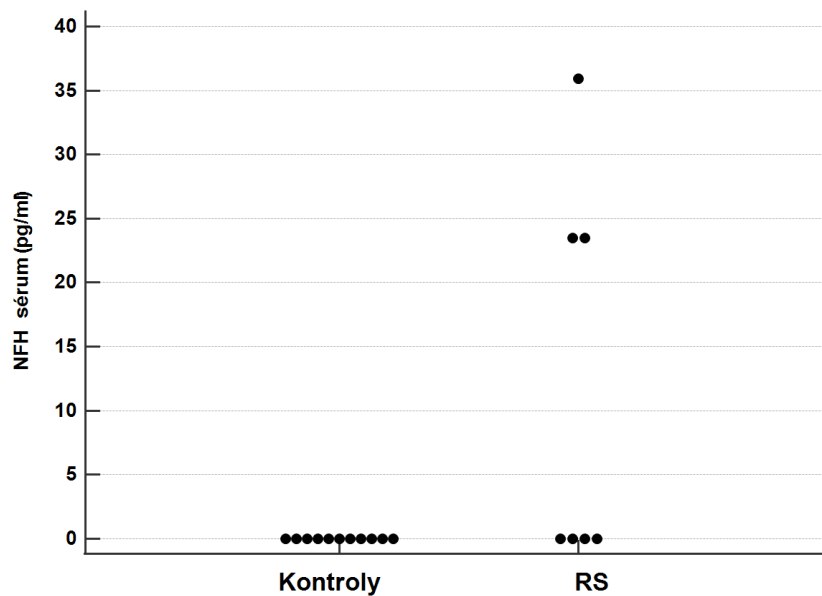
Obrázek 10 - Box-plot graf pro poměry koncentrací NFL/NFH v MMM u kontrolní skupiny a pacientů s RS (n. s.)

V hodnotách pro poměr koncentrací NFL/NFH v MMM není mezi pacienty s RS a kontrolní skupinou signifikantní rozdíl.

Na obrázku 11 a 12 jsou bodové grafy zobrazující sérové koncentrace NFL a NFH kontrolní skupiny a pacientů s RS. Sérové hodnoty jsou bez statistického hodnocení. Grafy jsou zde umístěny pro porovnání s naměřenými koncentracemi NFL a NFH v MMM.



Obrázek 11 - Graf koncentrací NFL v séru u kontrolní skupiny a pacientů s RS

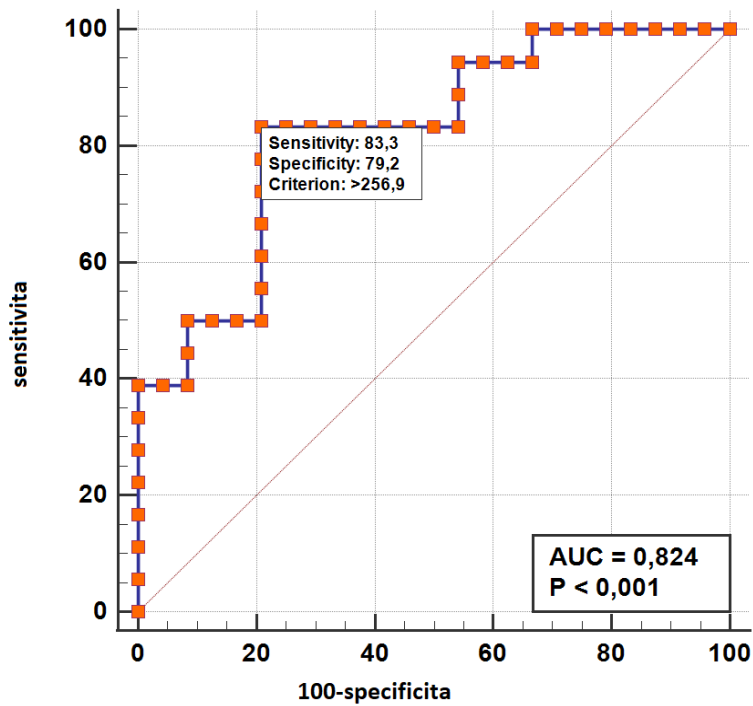


Obrázek 12 - Graf koncentrací NFH v séru u kontrolní skupiny a pacientů s RS

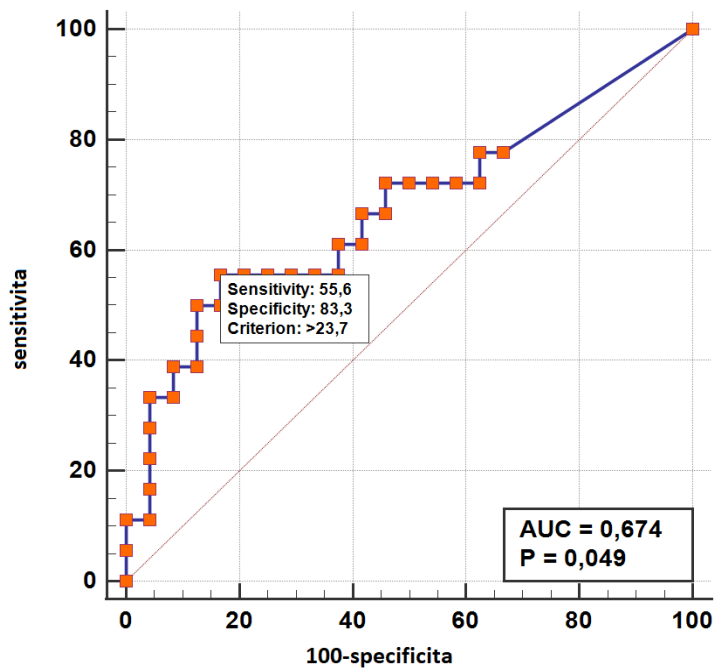
Tabulka 6 - Koncentrace NFL, NFH a hodnoty poměru NFL/NFH pacientů s RS a kontrolní skupiny

Koncentrace (pg/ml) NFL v MMM		
	KONTROLY	RS
n	24	18
minimum	74,9	143,6
maximum	963,0	1795
medián	183,1	567,4
R 5-95	76,7 - 891,0	153,7 - 1742,1
R 10-90	86,3 - 574,1	169,3 - 1634,6
R 25-75	128,9 - 251,4	340,0 - 1426,9
Koncentrace (pg/ml) NFH v MMM		
	KONTROLY	RS
n	24	18
minimum	0	0
maximum	289,5	497,5
medián	8,0	28,9
R 5-95	0 - 116,2	0 - 486,9
R 10-90	0 - 34,0	0 - 415,0
R 25-75	0 - 18,7	2,0 - 53,4
Poměr koncentrací NFL/NFH v MMM		
	KONTROLY	RS
n	24	18
minimum	2,0	3,0
maximum	522,0	704,0
medián	30,0	22,0
R 5-95	4,1 - 464,6	3,0 - 673,6
R 10-90	5,9 - 265,4	3,0 - 523,9
R 25-75	7,0 - 193,5	6,0 - 178,0

n – počet osob ve skupině; *R* – rozmezí percentilů;
NFL: $p < 0,001$; *NFH*: $p = 0,05$; *NFL/NFL*: *n. s.*



Obrázek 13 - ROC křivka pro NFL v MMM k rozlišení mezi pacienty s RS a kontrolní skupinou



Obrázek 14 - ROC křivka pro NFH v MMM k rozlišení mezi pacienty s RS a kontrolní skupinou

Na obrázku 13 a 14 jsou graficky znázorněny ROC křivky pro koncentrace NFL a NFH v MMM. V tabulce 7 jsou výsledky analýzy ROC křivek pro NFL a NFH

v MMM v podobě hodnot plochy pod křivkou (AUC), Youdenova indexu, sensitivity a specificity. Na základě hodnocení ROC křivek byly stanoveny hraniční neboli cut-off hodnoty pro NFL a NFH v MMM, které jsou také uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7 - Porovnání ROC křivek pro NFL a NFH v MMM

	NFL	NFH
AUC	0,824; 95% CI = 0,676 – 0,924; p < 0,0001	0,674; 95% CI = 0,512 – 0,810; p < 0,05
hraniční hodnota	256,90 pg/ml	23,70 pg/ml
Youdenův index	0,63	0,39
sensitivita	83,33 %	55,56 %
specificita	79,17 %	83,33 %

AUC – plocha pod křivkou; CI – interval spolehlivosti; p – hladina významnosti

Podle hodnoty plochy pod křivkou můžeme přesnost diagnostického testu pro koncentraci NFL hodnotit jako velmi dobrou (AUC = 0,824). U stanovení koncentrace NFH v MMM byla přesnost diagnostického testu nižší, ale stále ještě dostatečná (AUC = 0,674).

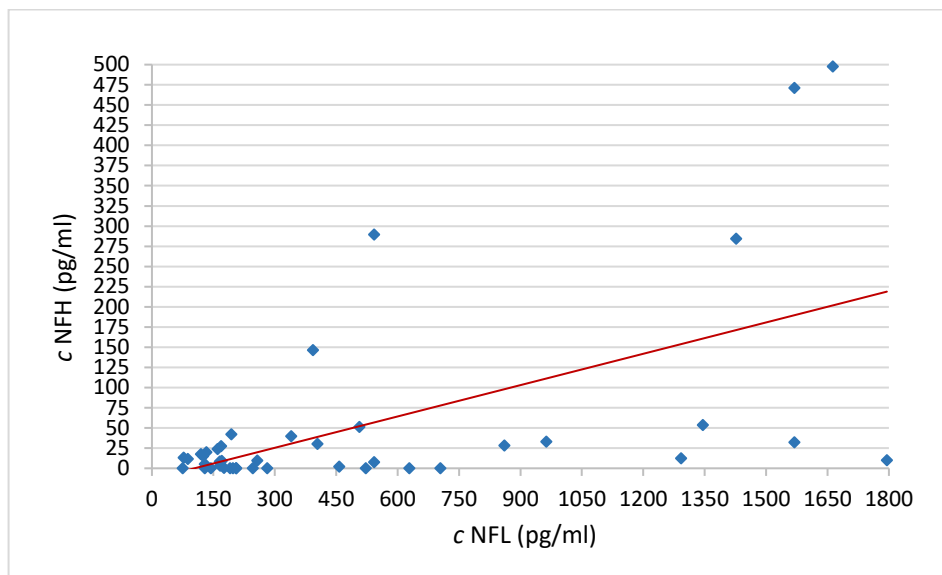
V tabulce 8 jsou uvedeny hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu R , v případě signifikantního vztahu jsou zde uvedeny i příslušné hladiny významnosti p . Signifikantní vztah vyšel pouze u korelace mezi koncentracemi NFL a NFH v MMM zahrnující naměřené hodnoty kontrolní skupiny i skupiny pacientů s RS. Korelace koncentrací NFL vs. NFH v MMM u pacientů s RS vyšla hraniční ($p = 0,06$). U ostatních korelací výsledný vztah nebyl signifikantní.

Tabulka 8 - Hodnoty Spearmanova korelačního koeficient

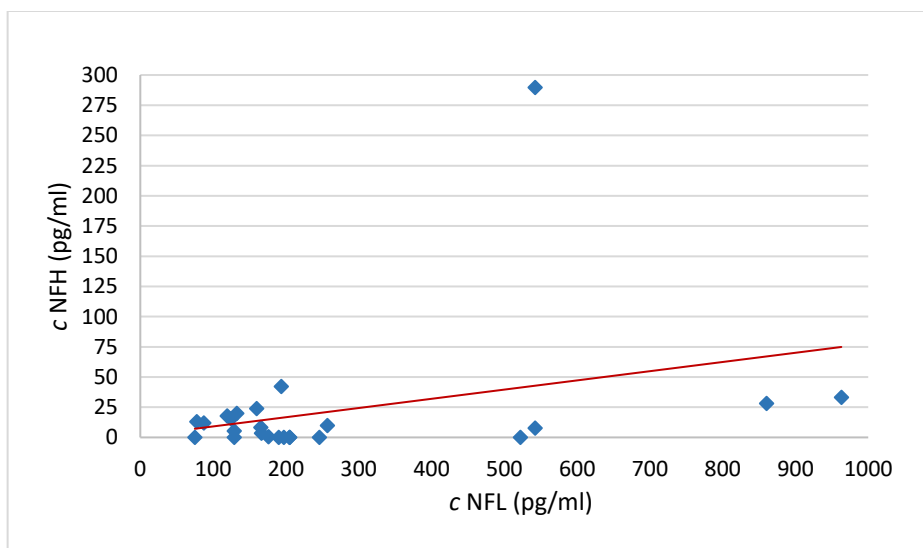
skupina	korelace mezi	n	R	p
KS + RS	NFL vs. NFH	42	0,38	0,014
KS	NFL vs. NFH	24	0,09	n. s.
KS	věk vs. NFL	24	0,27	n. s.
KS	věk vs. NFH	24	0,08	n. s.
KS	věk vs. NFL/NFH	24	-0,12	n. s.
RS	NFL vs. NFH	18	0,45	0,060
RS	věk vs. NFL	18	0,19	n. s.
RS	věk vs. NFH	18	0,34	n. s.
RS	věk vs. NFL/NFH	18	-0,25	n. s.

*KS - kontrolní skupina; RS - pacienti s RS; n - počet vyšetřených vzorků (osob);
 R - Spearmanův koeficient; p - hladina významnosti; n. s. - není signifikantní*

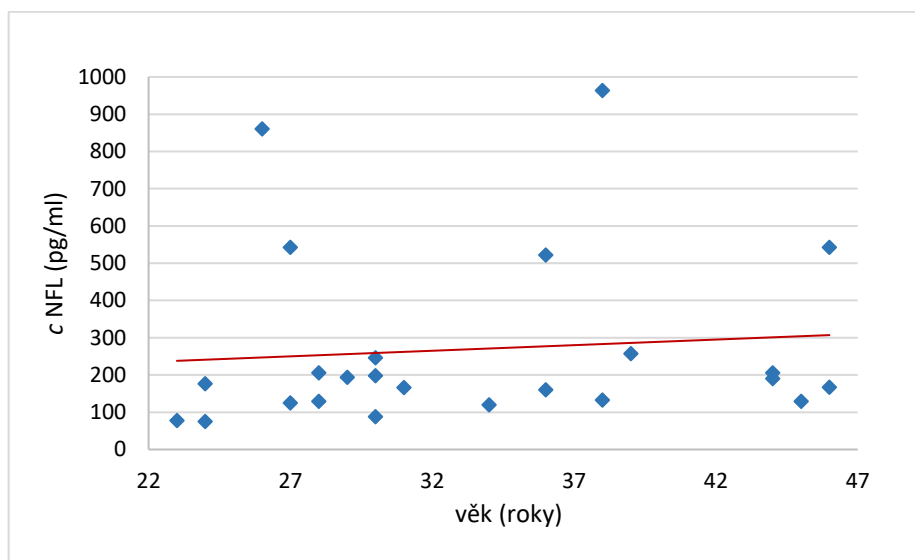
Na následujících obrázcích 15-23 jsou všechny korelace uvedené v tabulce 8 graficky znázorněny pomocí bodových grafů s přímkami lineární regrese.



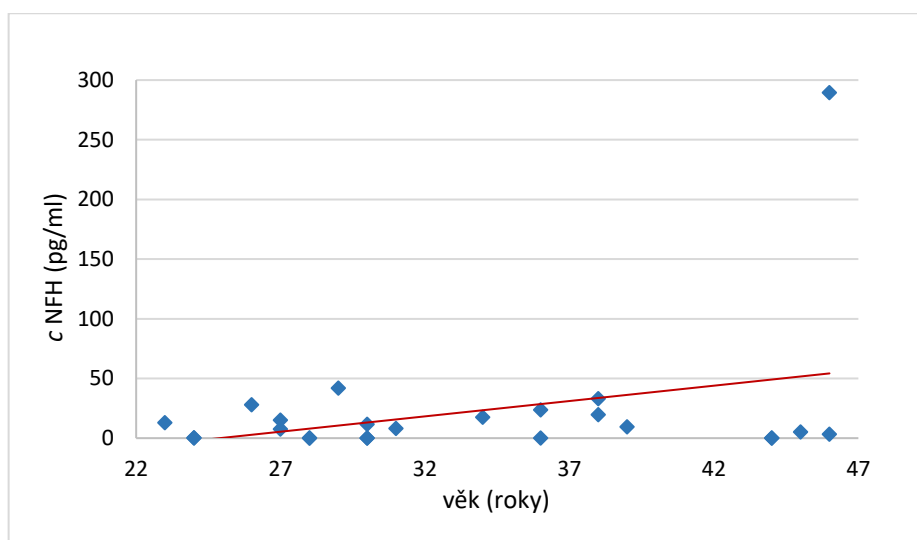
Obrázek 15 - Korelace mezi koncentracemi NFL a NFH v MMM u celého souboru



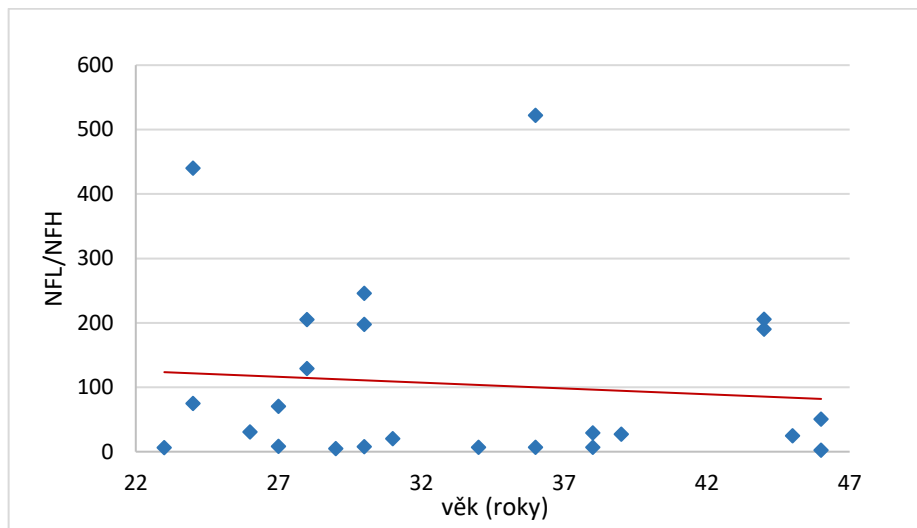
Obrázek 16 - Korelace mezi koncentracemi NFL a NFH v MMM u kontrolní skupiny



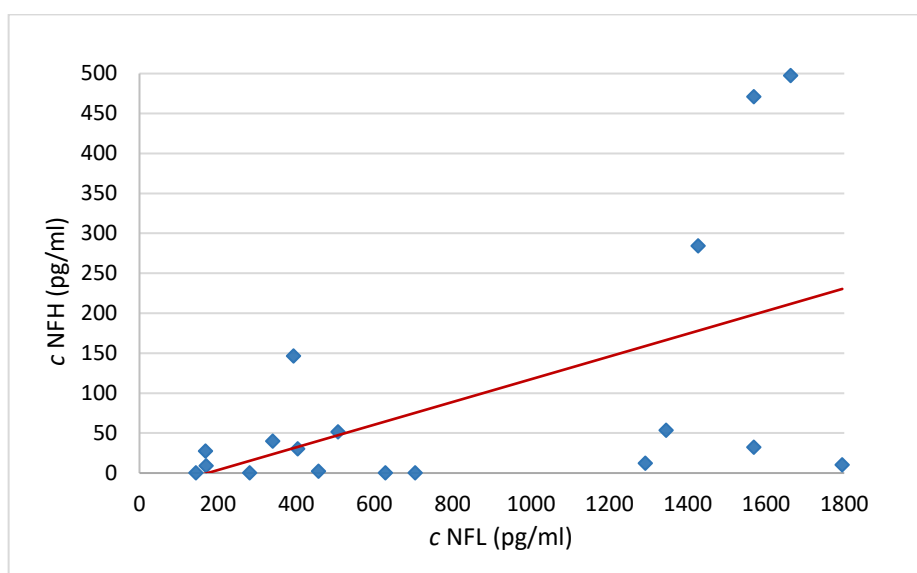
Obrázek 17 - Korelace mezi věkem a koncentrací NFL v MMM u kontrolní skupiny



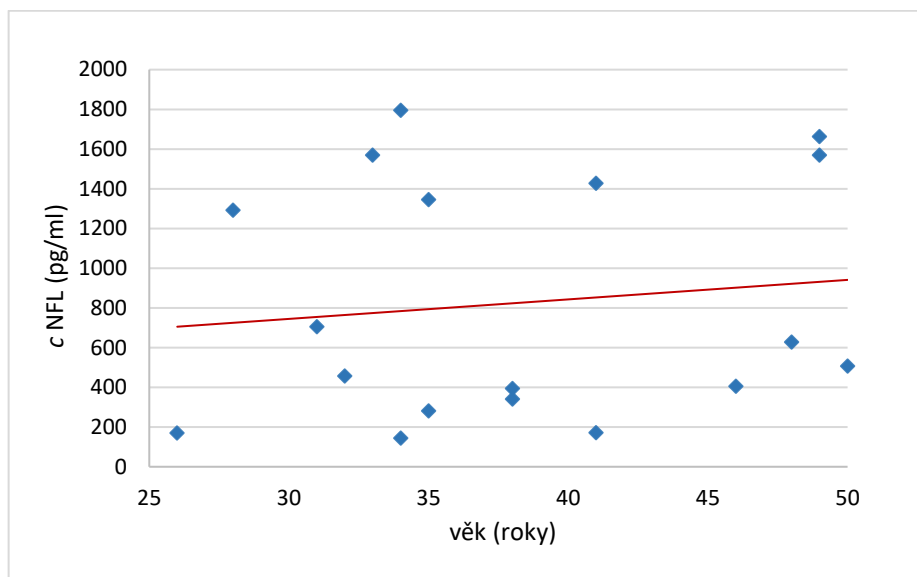
Obrázek 18 - Korelace mezi věkem a koncentrací NFH v MMM u kontrolní skupiny



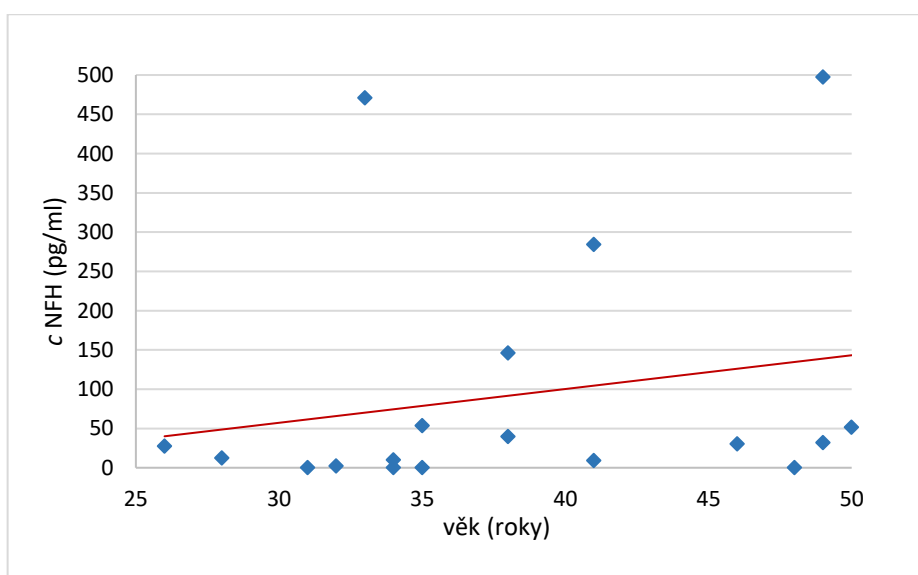
Obrázek 19 - Korelace mezi věkem a poměrem koncentrací NFL/NFH v MMM u kontrolní skupiny



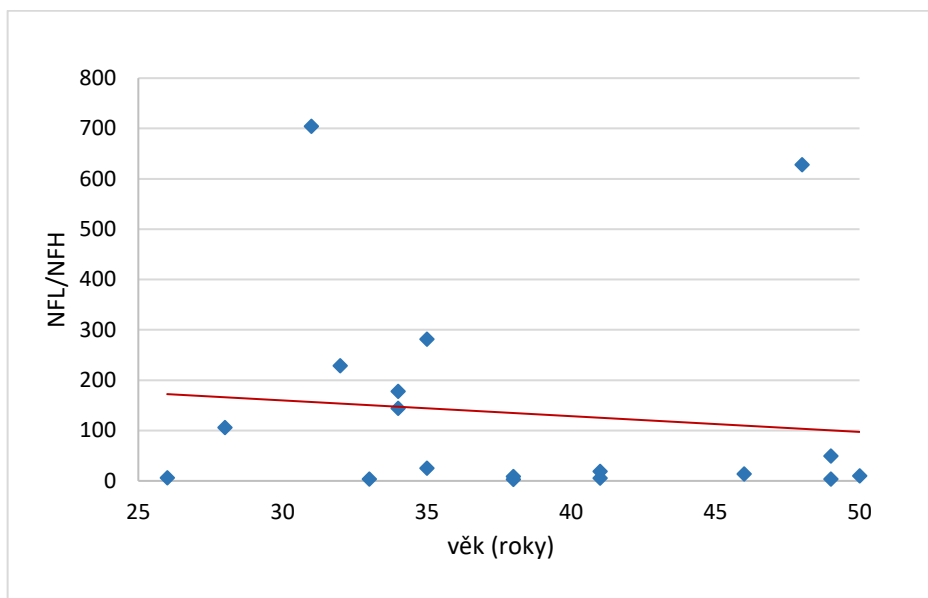
Obrázek 20 - Korelace mezi koncentracemi NFL a NFH v MMM u pacientů s RS



Obrázek 21 - Korelace mezi věkem a koncentrací NFL v MMM u pacientů s RS



Obrázek 22 - Korelace mezi věkem a koncentrací NFH v MMM u pacientů s RS



Obrázek 23 - Korelace mezi věkem a poměrem koncentrací NFL/NFH v MMM u pacientů s RS

6 DISKUZE

RS je závažné autoimunitní onemocnění, při kterém dochází k zánětlivému poškození neuronů. Je to nevléčitelné onemocnění, ale průběh nemoci lze značně zpomalit včasným nasazením účinných léků, kterých rok od roku na trhu stále přibývá. Z toho důvodu je velmi důležité onemocnění včas a přesně diagnostikovat. V současné době se diagnóza opírá o klinické vyšetření, snímky z MR a vyšetření MMM izoelektrickou fokusací, čímž se prokazuje přítomnost oligoklonálních proužků dokazujících intrathekální syntézu imunoglobulinů.

Po nasazení farmakologické léčby nastává potřeba sledovat její účinnost. V této oblasti probíhá v současné době mnoho studií na biomarkery detekovatelné v MMM, nebo ještě lépe v séru, které by odrážely aktuální stav pacienta z hlediska poškození neuronů způsobeného RS. V tomto směru jsou momentálně nejnadějnějšími biomarkery - neurofilamenta [26].

Neurofilamenta jsou specifickou součástí cytoskeletu neuronů. Hojně se vyskytují v axonech, kde se podílejí na udržování jejich tvaru a velikosti. Neurofilamenta jsou podle molekulové hmotnosti tvořena ze tří podjednotek – NFL, NFM a NFH [34].

Ukazuje se, že nejvhodnější pro stanovování, z důvodu nízké molekulové hmotnosti, jsou NFL. V případě neuronálního poškození totiž dochází k uvolňování neurofilament do MMM, a následně se přestupem přes HEB dostávají i do periferní krve. Mezi koncentrací NFL v MMM a v séru byla prokázána silná korelace [34].

Z toho vyplývá, že sérové koncentrace NFL a NFH budou nižší než koncentrace NFL a NFH v MMM, což se také potvrdilo. U 15 osob z 18 vyšetřovaných se koncentrace NFH nacházela pod detekčním limitem použité soupravy. U koncentrací NFL byla situace o něco lepší, zde byly pouze u 4 osob z 18 koncentrace pod detekčním limitem. Pro důkaz nižších koncentrací NFL

a NFH v séru byly do výsledků vloženy obrázky 11 a 12 znázorňující formou bodových grafů jednotlivé naměřené sérové koncentrace NFL a NFH.

Koncentrace NFL a NFH v séru donedávna nebyly měřitelné z důvodu absence dostatečně citlivého testu. Dnes jsou již k dostání vysoce citlivé testy Simoa, které vykazují 126krát vyšší citlivost než námi použité ELISA soupravy, proto jsou neurofilamenta v séru teprve teď detailně studována [40].

V mnoha nezávislých studiích byla prokázána vyšší koncentrace NFL v MMM u pacientů s RS než u kontrolní skupiny. Testování byli zvláště pacienti s různými formami RS (RR-RS, PP-RS, SP-RS) a s CIS, u všech byla prokázána signifikantně vyšší koncentrace NFL v MMM oproti kontrolní skupině. Dalším potenciálním biomarkerem aktivity RS je NFH. Podle některých studií koncentrace NFH v MMM korelují s EDSS hodnocením u pacientů s RS. V porovnání s NFL nejsou podle koncentrace NFH v MMM dobře rozlišitelné zdravé osoby od pacientů s RS, proto se od výzkumného měření koncentrací NFH upouští [26; 34; 41].

Pomocí Mannova-Whitnyova testu jsem tyto hypotézy ověřila a naměřené hodnoty graficky zobrazila pomocí box-plot grafů (obrázky 8-10). Výsledkem jsou signifikantně zvýšené koncentrace NFL v MMM ($p < 0,001$) u pacientů s RS oproti kontrolní skupině. Mezi pacienty s RS byli zařazeni pouze pacienti s RR-RS formou tohoto onemocnění, tím je můj výsledek omezen pouze na tuto skupinu pacientů. Koncentrace NFH v MMM u pacientů s RS jsou zvýšené v porovnání s kontrolní skupinou ($p = 0,054$), rozdíly byly na hranici statistické signifikance. V poměru koncentrací NFL/NFH v MMM nebyl mezi pacienty s RS a kontrolní skupinou signifikantní rozdíl a tento poměr nezlepšuje přínos stanovení neurofilament v MMM.

Dále je nutné podotknout, že zvýšené hladiny NFL jsou markerem neurodegenerace. Zvýšené hladiny NFL v MMM a v séru mohou být způsobeny kromě RS i demencí, cévní mozkovou příhodou, Creutzfeldovou-Jacobsovou

nemoci či jinými neurologickými onemocněními. NFL tedy nejsou specifické pro RS [34; 37].

Prokázala jsem signifikantní vztah u korelace mezi NFL a NFH v MMM zahrnující naměřené hodnoty kontrolní skupiny i pacientů s RS ($p = 0,014$). V případě korelace mezi koncentracemi NFL a NFH v MMM u pacientů s RS nebyla korelace prokázána, ale výsledek byl pouze hraničně nesignifikantní ($p = 0,060$). V tabulce 6 si můžeme všimnout, že i když tyto koncentrace NFL a NFH v MMM spolu korelují, maximální hodnoty a mediány jsou v případě koncentrací NFL mnohem vyšší než u koncentrací NFH v MMM. To může být také jeden z důvodů, proč je výhodnější měřit koncentrace NFL.

Fyziologicky se koncentrace NFL zvyšují s věkem, ale u RS v souvislosti s věkem nebyla nalezena nebo byla negativní [34; 42].

Pomocí Spearmanova korelačního koeficientu (tabulka 8) jsem ověřovala korelaci koncentrace NFL, NFH v MMM a jejich poměru s věkem pacientů s RS a s věkem kontrolní skupiny. Neprokázala jsem signifikantní vztah mezi těmito parametry, nejen ve skupině pacientů, ale ani v kontrolní skupině, v níž však byly zastoupeni rovněž pacienti s různými neurologickými onemocněními.

Pomocí ROC křivky jsem se pokusila stanovit hraniční koncentraci pro NFL a NFH v MMM. Hraniční koncentrace u NFL v MMM vyšla na $c = 256,9$ pg/ml, zatímco u NFH v MMM byla rovna $c = 23,7$ pg/ml. Na základě těchto hraničních koncentrací byla stanovena senzitivita a specifická diagnostických testů. U NFL vyšla senzitivita i specifická kolem 80 %, zatímco u NFH vyšla senzitivita poměrně nízká (lehce přes 50 %), specifická vyšla obdobně jako u NFL. Nízká senzitivita značí citlivost neboli schopnost testu zachycovat skutečně nemocné, proto se měření koncentrace NFH za účelem stanovení diagnózy RS jeví jako nevyhovující.

Pro lepší zhodnocení přesnosti stanovené hraniční koncentrace pro diagnostické účely jsem porovnávala hodnoty plochy pod křivkou (AUC) s tabulkovým rozmezím. Přesnost testu u NFL v MMM byla velmi dobrá (AUC = 0,82), u NFH pouze dostatečná (AUC = 0,67). Tyto výsledky jsou srovnatelné s výsledky studie Kuhle a spol. [43].

Dále jsem pomocí Youdenova indexu porovnávala výkonnost testu, přičemž nejlepší výkon je pro hodnotu 1. U koncentrace NFL v MMM vyšla hodnota indexu na 0,63 a u koncentrace NFH v MMM jen na 0,39.

Ačkoliv jsou prokázány signifikantně vyšší koncentrace NFL u pacientů s RS v porovnání s kontrolní skupinou, naměřené koncentrace jsou také často značně variabilní a překrývají se. To komplikuje stanovení přesné hraniční koncentrace pro rozlišení pacientů s RS od zdravých osob. Z toho důvodu se do budoucna nepředpokládá využití měření koncentrace NFL jako diagnostického testu pro RS [44].

Dalším důvodem, proč nelze koncentrace neurofilament takto využít je jejich již zmíněná nespecifičnost pro toto onemocnění. I přesto může být měření NFL velkým přínosem pro monitorování stavu pacienta s RS a účinnosti farmakologické léčby. Dále může pomoci s určením formy tohoto onemocnění a stanovením prognózy [38; 40; 44].

Obzvláště užitečný by byl tento biomarker v případě možnosti stanovování jeho koncentrace v séru, protože odběr žilní krve je méně invazivní, a pro pacienta mnohem příjemnější než lumbální punkce, kterou navíc nelze tak často opakovat [34; 44].

7 ZÁVĚR

Předmětem práce bylo provést vlastní analýzu naměřených koncentrací NFL a NFH v MMM a krvi metodou ELISA u pacientů s RS a kontrolní skupiny v souvislosti s jejich možným zavedením do klinické praxe jako biomarkeru neurodegenerace u pacientů s RS.

Mou vlastní statistickou analýzou byla prokázána vyšší koncentrace NFL a NFH v MMM u pacientů s RS oproti kontrolní skupině, větší signifikantní rozdíl byl však pouze u NFL. Korelační koeficient prokázal signifikantní vztah u korelace koncentrací NFL vs. NFH v MMM zahrnující naměřené koncentrace biomarkerů z obou skupin. Vyhodnocení pomocí ROC křivek ukázalo přesnost testu u NFL v MMM jako velmi dobrou, na rozdíl od pouze dostatečné u NFH. Tyto výsledky ukazují, že zejména NFL mají dobré předpoklady stát se užitečným biomarkerem u RS.

Koncentrace NFL i NFH jsou mnohonásobně nižší v séru oproti MMM. Tím se sérové koncentrace stávají hůře měřitelné. Nicméně pro rutinní vyšetřování pacientů s RS je tato varianta stanovení daleko zajímavější. Odběr žilní krve je totiž mnohem jednodušší, méně bolestivější a lze ho opakovat častěji než odběr MMM lumbální punkcí.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AMK – aminokyseliny
- APC – antigen prezentující buňky
- CIS – klinicky izolovaný syndrom
- CNS – centrální nervová soustava
- DIS – diseminace v prostoru
- DIT – diseminace v čase
- EDSS – Expanded Disability Status Scale (Kurtzkeho stupnice)
- ELISA – enzyme-linked immuno sorbent assay
- HEB – hematoencefalická bariéra
- HLB – hematolikvorová bariéra
- IEF – izoelektrická fokusace
- IF – intermediární filamenta
- IFN - interferon
- IL – interleukin
- IS – imunitní systém
- KEB – koeficient energetické bilance
- KD – kostní dřeň
- MAPs – proteiny asociované s mikrotubuly
- MMM – mozkomíšní mok, likvor
- MR – magnetická rezonance
- MTOC – mikrotubuly organizující centrum
- NFL – lehké řetězce neurofilament
- NFH – těžké řetězce neurofilament
- NFM – střední řetězce neurofilament
- NMOSD – neuromyelitis optika a choroby jejího širšího spektra
- OCT – optická koherenční tomografie
- pI – izoelektrický bod

PP-RS – primárně progresivní roztroušená skleróza

P-RS – progresivní roztroušená skleróza

RIS – radiologicky izolovaný syndrom

ROC - Receiver Operating Characteristic

RR-RS – relabující-remitující roztroušená skleróza

RS – roztroušená skleróza

SIMOA – single molecule array

SP-RS – sekundárně progresivní roztroušená skleróza

TNF – tumor nekrotizující faktor

VEP – zrakové (vizuální) evokované potenciály

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Úvod. In: VALIŠ, Martin a Zbyšek PAVELEK. *Roztroušená skleróza pro praxi*. 2. vydání. Praha: Maxdorf, 2020, s. 10-11. ISBN 978-80-7345-672-6.
- [2] Etiopatogeneze. In: VALIŠ, Martin a Zbyšek PAVELEK. *Roztroušená skleróza pro praxi*. 2. vydání. Praha: Maxdorf, 2020, s. 12-22. ISBN 978-80-7345-672-6.
- [3] Co je roztroušená skleróza? In: HAVRDOVÁ, Eva. *Roztroušená skleróza v praxi* [online]. Praha: Galén, 2015, s. 11-12 [cit. 2022-02-08]. ISBN 978-80-7492-209-1. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/e-kniha/roztrousena-skleroza-v-praxi-751924/>
- [4] AMPAPA, Radek. Aktuální diagnostická kritéria roztroušené sklerózy. *Medicína po promoci*. 2019, **20**(1), 70-73. ISSN 1212-9445.
- [5] ČAPOUN, Vít. Umíme predikovat průběh roztroušené sklerózy? *Profi medicína*. 2020, **5**(1), 29. ISSN 2571-2527.
- [6] Neuroimunologie a patologie roztroušené sklerózy. In: HAVRDOVÁ, Eva. *Roztroušená skleróza v praxi* [online]. Praha: Galén, 2015, s. 13-24 [cit. 2022-02-08]. ISBN 978-80-7492-209-1. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/e-kniha/roztrousena-skleroza-v-praxi-751924/>
- [7] BARAC, I. S., V. VĂCĂRAȘ, A. COZMA a L. M. PROCOPCIUC. Multiple sclerosis - behind the immunity curtains. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2020, **83/116**(4), 368-374 [cit. 2021-10-29]. ISSN 1802-4041. Dostupné z: doi:10.14735/amcsnn2020368
- [8] Základní pojmy a principy nervové soustavy. In: SEIDL, Zdeněk. *Neurologie pro studium i praxi* [online]. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2015, s. 54-58 [cit. 2022-02-08]. ISBN 978-80-247-9656-7. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/e-kniha/neurologie-pro-studium-i-praxi-751921>

- [9] Biofyzikální koncepce hematolikorové bariéry. In: ZEMAN, David. *Praktický průvodce laboratorním vyšetřením likvoru*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2018, s. 11-16. ISBN 978-80-244-5262-3.
- [10] PIŤHA, J. Bariéry nervového systému za fyziologických a patologických stavů. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2014, **77/110**(5), 553–559 [cit. 2021-11-07]. ISSN 1802-4041. Dostupné z: doi:10.14735/amcsnn2014553
- [11] SLÁDKOVÁ, Vladimíra a Jan MAREŠ. Likvorová diagnostika roztroušené sklerózy. *Postgraduální medicína*. 2015, **17**(1), 19-22. ISSN 1212-4184.
- [12] Klinické projevy. In: VALIŠ, Martin a Zbyšek PAVELEK. *Roztroušená skleróza pro praxi*. 2. vydání. Praha: Maxdorf, 2020, s. 23-27. ISBN 978-80-7345-672-6.
- [13] Klinické příznaky roztroušené sklerózy. In: HAVRDOVÁ, Eva. *Roztroušená skleróza v praxi* [online]. Praha: Galén, 2015, s. 25-40 [cit. 2022-02-08]. ISBN 978-80-7492-209-1. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/e-kniha/roztrousena-skleroza-v-praxi-751924/>
- [14] Roztroušená skleróza. In: SEIDL, Zdeněk. *Neurologie pro studium i praxi* [online]. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2015, s. 270-278 [cit. 2022-02-08]. ISBN 978-80-247-9656-7. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/e-kniha/neurologie-pro-studium-i-praxi-751921>
- [15] Diagnostika a klasifikace. In: VALIŠ, M. a Z. PAVELEK. *Roztroušená skleróza pro praxi*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Maxdorf, 2020, s. 28-42. ISBN 978-80-7345-672-6.
- [16] AMPAPA, Radek. Diagnostika a léčba sekundárně progresivní roztroušené sklerózy. *Acta medicae*. 2020, **9**(3), 72-74. ISSN 1805-398X.

- [17] KATZ SAND, Ilana. Klasifikace, diagnostika a diferenciální diagnostika roztroušené sklerózy. *Current opinion in neurology*. 2016, 7(1), 2-12. ISSN 1804-5669.
- [18] Diagnostika roztroušené sklerózy. In: HAVRDOVÁ, Eva. *Roztroušená skleróza v praxi* [online]. Praha: Galén, 2015, s. 41-52 [cit. 2022-02-08]. ISBN 978-80-7492-209-1. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/e-kniha/roztrousena-skleroza-v-praxi-751924>
- [19] Česká neurologická společnost - THOMPSON, A. J., Brenda L. BANWELL, Frederik BARKHOF, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* [online]. December 21, 2017, 2018(February), 162-173 [cit. 2021-09-30]. PMID:29275977. Dostupné z: DOI:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
- [20] KUBALA HAVRDOVÁ, Eva a Jiří PÍTHA. *Klinický doporučený postup pro diagnostiku a léčbu roztroušené sklerózy a neuromyelitis optica a onemocnění jejího širšího spektra* [online]. 27.4. 2020 [cit. 2021-10-17]. Dostupné z: https://www.czech-neuro.cz/content/uploads/2020/04/rs_odborna-2.0_final_pub_web-2.pdf
- [21] Mozkomíšni mok. In: FIALA, Pavel a Jiří VALENTA. *Přehled anatomie centrálního nervového systému*. Praha: Karolinum, 2020, s. 124-125. ISBN 978-80-246-4477-6.
- [22] DUŠKOVÁ, Jaroslava a Ondřej SOBEK. Cytologické vyšetření mozkomíšního moku. *Česko-slovenská patologie* [online]. 2019, 55(3), 145-157 [cit. 2021-09-28]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz>
- [23] Základní vyšetření. In: ZEMAN, David. *Praktický průvodce laboratorním vyšetřením likvoru*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2018, s. 21-32. ISBN 978-80-244-5262-3.
- [24] Kvalitativní cytologické vyšetření. In: ZEMAN, David. *Praktický průvodce laboratorním vyšetřením likvoru*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2018, s. 33-69. ISBN 978-80-244-5262-3.

- [25] Detekce intrathekální protilátkové odpovědi. In: ZEMAN, David. *Praktický průvodce laboratorním vyšetřením likvoru*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2018, s. 76-116. ISBN 978-80-244-5262-3.
- [26] PETRŽALKA, M., E. MELUZÍNOVÁ, J. LIBERTÍNOVÁ, J. HANZALOVÁ a P. MARUSIČ. Biomarkery progresu onemocnění a prognózy u pacientů s roztroušenou sklerózou. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2018, **81**(4), 404-409 [cit. 2021-06-18]. ISSN 1802-4041. Dostupné z: DOI: 10.14735/amcsnn2018404
- [27] TLAPÁKOVÁ, Jana. Neurofilamenta - slibný biomarker aktivity RS pro běžnou praxi? *Remedia*. 2018, **28**(6), 582-584. ISSN 0862-8947.
- [28] Farmakoterapie. In: VALIŠ, Martin a Zbyšek PAVELEK. *Roztroušená skleróza pro praxi*. 2. vydání. Praha: Maxdorf, 2020, s. 55-72. ISBN 978-80-7345-672-6.
- [29] Schéma terapie roztroušené sklerózy. *Neurologie pro praxi*. 2020, **21**, 18-19. ISSN 1213-1814.
- [30] Cytoskelet. In: VAJNER, Luděk, Jiří UHLÍK a Václava KONRÁDOVÁ. *Lékařská histologie I.: Cytologie a obecná histologie*. 2. vydání. Karolinum, 2018, s. 25-30. ISBN 978-80-246-4106-5.
- [31] Další orgány neuronu. In: OREL, Miroslav. *Nervové buňky a jejich svět*. Pardubice: Grada, 2015, s. 62-67. ISBN 978-80-247-5070-5.
- [32] Cytoskelet a buněčný pohyb. In: SLÁDEK, Zbyšek. *Buněčná biologie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, s. 65-72. ISBN 978-80-7375-086-2.
- [33] ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS and P. WALTER. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science, 2002. ISBN 0-8153-3218-1.
- [34] VARHAUG, Kristin N., Øivind TORKILDSEN, Kjell-Morten MYHR and Christian N. VEDELER. Neurofilament Light Chain as a Biomarker

- in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Neurology* [online]. 2019, **2019** [cit. 2022-02-09]. PMID: 31024432, PMCID: PMC6460359. Dostupné z: doi:10.3389/fneur.2019.00338
- [35] FIALOVÁ, Lenka. Neurofilaments in Multiple Sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2019, **5**(1), 6-12.
- [36] Další analyty vyšetřované v likvoru ve speciálních indikacích. In: ZEMAN, David. *Praktický průvodce laboratorním vyšetřením likvoru*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2018, s. 117-127. ISBN 978-80-244-5262-3.
- [37] FIALOVÁ, L., A. BARTOŠ a J. ŠVARCOVÁ. Lehké řetězce neurofilament v séru a mozkomíšním moku a stav hematolikorové bariéry u vybraných neurologických onemocnění. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2018, **81**(2), 185-192 [cit. 2022-02-07]. ISSN 1802-4041. Dostupné z: doi:10.14735/amcsnn2018185
- [38] PIŤHA, J. Biomarkery roztroušené sklerózy – současné možnosti a perspektivy. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2015, **78/111**(3), 269-273 [cit. 2022-02-07]. ISSN 1802-4041. Dostupné z: <https://www.csn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie>
- [39] POLMAN et al. Lublin a Reingold, 1996 [online]. 2005 [cit. 2022-04-11].
- [40] DISANTO, Giulio, Christian BARRO, Pascal BANKERT, Yvonne NAEGELIN, Sabine SCHÄDELIN a Antonella GIARDIELLO et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Annals of neurology* [online]. 2017, **81**(6), 857–870 [cit. 2022-04-12]. ISSN 1531-8249. PMID: 28512753. Dostupné z: doi:10.1002/ana.24954
- [41] DAMASCENO, Alfredo, Rafael Paterno C. DIAS-CARNEIRO, Adriel SANTOS MORAES, Benito PEREIRA DAMASCENO, Leonilda Maria BARBOSA DOS SANTOS a Fernando CENDES et al. Clinical and MRI correlates of CSF neurofilament light chain levels in relapsing and

- progressive MS. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* [online]. 2019, **30**, 149-153 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z:
doi:<https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.02.004>
- [42] BRIDEL, Claire, Wessel N VAN WIERINGEN, Henrik ZETTERBERG, Betty M TIJMS a Charlotte E TEUNISSEN, et al. Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein in Neurology: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* [online]. 2019, **76**(9), 1035-1048 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z:
doi:[10.1001/jamaneurol.2019.1534](https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.1534)
- [43] KUHLE, Jens, Kim PLATTNER, Jonathan P. BESTWICK, Raija L LINDBERG and Sreeram V RAMAGOPALAN, et al. A comparative study of CSF neurofilament light and heavy chain protein in MS. *Multiple Sclerosis Journal* [online]. 2013, **19**(12), 1597-1603 [cit. 2022-04-18]. Dostupné z: doi:[10.1177/1352458513482374](https://doi.org/10.1177/1352458513482374)
- [44] DOMINGUES, R. B., G. B. P. FERNANDES, F. B. Vilela de Moura LEITE a Carlos SENNE. Neurofilament light chain in the assessment of patients with multiple sclerosis. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* [online]. 2019, **77**(6) [cit. 2022-04-14]. Dostupné z:
<https://www.scielo.br/j/anp/a/cKQRyKcNx9dxjKfHrdVf8Qr/?lang=en>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Saltatorní vedení vzruchů v myelinizovaném nervovém vláknu	13
Obrázek 2 - Stavba hematoencefalické bariéry	14
Obrázek 3 - Srovnání atraumatické punkční jehly (nahore) a klasické punkční jehly (dole).....	22
Obrázek 4 - Oligoklonální pásy v MMM bez přítomnosti v séru	25
Obrázek 5 – Mikrotubulus	28
Obrázek 6 – Mikrofilamentum	29
Obrázek 7 - Schéma struktury řetězců neurofilament	31
Obrázek 8 - Box-plot graf pro koncentrace NFL v MMM u kontrolní skupiny a pacientů s RS ($p < 0,001$)	47
Obrázek 9 - Box-plot graf pro koncentrace NFH v MMM u kontrolní skupiny a pacientů s RS ($p = 0,054$).....	48
Obrázek 10 - Box-plot graf pro poměry koncentrací NFL/NFH v MMM u kontrolní skupiny a pacientů s RS (n. s.).....	49
Obrázek 11 - Graf koncentrací NFL v séru u kontrolní skupiny a pacientů s RS	50
Obrázek 12 - Graf koncentrací NFH v séru u kontrolní skupiny a pacientů s RS	50
Obrázek 13 - ROC křivka pro NFL v MMM k rozlišení mezi pacienty s RS a kontrolní skupinou	52
Obrázek 14 - ROC křivka pro NFH v MMM k rozlišení mezi pacienty s RS a kontrolní skupinou	52
Obrázek 15 - Korelace mezi koncentracemi NFL a NFH v MMM u celého souboru	55
Obrázek 16 - Korelace mezi koncentracemi NFL a NFH v MMM u kontrolní skupiny	55

Obrázek 17 - Korelace mezi věkem a koncentrací NFL v MMM u kontrolní skupiny	56
Obrázek 18 - Korelace mezi věkem a koncentrací NFH v MMM u kontrolní skupiny	56
Obrázek 19 - Korelace mezi věkem a poměrem koncentrací NFL/NFH v MMM u kontrolní skupiny	57
Obrázek 20 - Korelace mezi koncentracemi NFL a NFH v MMM u pacientů s RS	57
Obrázek 21 - Korelace mezi věkem a koncentrací NFL v MMM u pacientů s RS	58
Obrázek 22 - Korelace mezi věkem a koncentrací NFH v MMM u pacientů s RS	58
Obrázek 23 - Korelace mezi věkem a poměrem koncentrací NFL/NFH v MMM u pacientů s RS	59

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 - Klasifikace RS	19
Tabulka 2 - McDonaldova diagnostická kritéria revidovaná v roce 2017	20
Tabulka 3 - Demografické údaje souboru	36
Tabulka 4 - Chemikálie obsažené v NF-light ELISA soupravě a jejich složení	39
Tabulka 5 - Chemikálie obsažené v ELISA soupravě pro měření NFH	41
Tabulka 6 - Koncentrace NFL, NFH a hodnoty poměru NFL/NFH pacientů s RS a kontrolní skupiny	51
Tabulka 7 - Porovnání ROC křivek pro NFL a NFH v MMM	53
Tabulka 8 - Hodnoty Spearmanova korelačního koeficient	54