

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Biomarkery neurodegenerativních onemocnění
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

ZUZANA SMÉKALOVÁ

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko-technologická

Biomarkery neurodegenerativních onemocnění
Bakalářská práce

2020

Zuzana Smékalová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Zuzana Smékalová**
Osobní číslo: **C18187**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Téma práce: **Biomarkery neurodegenerativních chorob**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Vypracování teoretického přehledu na základě studia odborné literatury.

Práce s katalogy a digitálnímu databázemi.

Analýza patientských vzorků metodou ELISA.

Zhodnocení naměřených výsledků a vyvození závěrů.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Jan Říčný, CSc.**
Národní ústav duševního zdraví
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č.7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna Prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Praze dne 30. 6. 2020

Zuzana Smékalová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především svému vedoucímu práce RNDr. Janu Říčnému, Csc. a Mgr. Gabriele Kocurové z Národního ústavu duševního zdraví nejen za odborné vedení a pomoc při vypracování bakalářské práce, ale také za přátelský a lidský přístup. Také děkuji Mgr. Lucii Stříbrné, PhD. za kontrolu a trpělivou pomoc s konečnou podobou práce.

V neposlední řadě děkuji svému muži, bez jehož podpory bych se neobešla, a svým dětem, které mě občas nechali pracovat.

ANOTACE

Cílem této bakalářské práce je rešeršní zpracování dostupných literárních zdrojů na téma Biomarkery neurodegenerativních onemocnění a popsat výsledky vlastního výzkumu, který by mohl vést k pozdějšímu vyvinutí diagnostické metody pro rutinní diagnostiku vybraných neurodegenerativních chorob. Výzkum probíhal v Národním ústavu duševního zdraví pod vedením RNDr. Jana Říchného, Csc. ve spolupráci se společností Vidia spol. s.r.o. Vestec

Pomocí metody ELISA jsme testovali plazmy a séra pacientů s neurodegenerativními poruchami na přítomnost autoprotilátek proti vybraným antigenům u mírné kognitivní poruchy (MCI), Alzheimerovy choroby (AN), frontotemporální lobární degenerace (FTLD), vaskulární demence (VD), Parkinsonovy demence, amyotrofické laterální sklerozy (ALS), demence s Lewyho tělisky (DLT) a kombinace několika těchto demencí. Výsledky experimentů jsou uvedeny v druhé části práce.

V první části bakalářské práce jsou rešeršně zpracovány dostupné informace o nejznámějších neurodegenerativních onemocněních, jsou uvedeny vybrané antigeny a protilátky a jejich role v organismu a hodnoty v průběhu onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

Neurodegenerativní onemocnění, Alzheimerova choroba, ELISA, antigen, autoprotilátka, biomarker

TITLE

Biomarkers of neurodegenerative diseases

ANOTATION

This bachelor thesis brings information from the available literature on the topic of Biomarkers of neurodegenerative diseases and describes the results of our own research, which could lead to the development of a diagnostic method for routine diagnosis of selected neurodegenerative diseases. The research took place at the National

Institute of Mental Health under the leadership of RNDr. Jan Říčný, Csc. in cooperation with Vidia spol. s.r.o.

Using ELISA, we tested plasmas and sera of patients with neurodegenerative disorders (mild cognitive impairment, Alzheimer's disease (AD), frontotemporal lobar degeneration (FTLD), vascular dementia (VD), Parkinson's dementia (PD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS), dementia with Lewy bodies (DLB) and combinations of several of these dementias) for the presence of autoantibodies to selected antigens.

.In the first part of the bachelor's thesis, the available information on the most well-known neurodegenerative diseases is written up, selected antigens and antibodies and their role in the organism and values during the disease are presented.

KEY WORDS

Neurodegenerative disease, Alzheimer's disease, ELISA, antigen, autoantibody, biomarker

OBSAH

ÚVOD	16
1 MÍRNÁ KOGNITIVNÍ PORUCHA	17
1.1 KLINICKÝ OBRAZ	17
1.2 DIAGNOSTIKA	17
1.3 LÉČBA.....	18
2 ALZHEIMEROVA CHOROBA	19
2.1 DĚLENÍ	19
2.2 RIZIKOVÉ FAKTORY VZNIKU	20
2.2.1 Autoprotilátky	20
2.2.2 Genetické faktory	20
2.2.2.1 Amyloidový prekurzorový protein (APP).....	20
2.2.2.2 Apolipoprotein E4.....	21
2.3 KLINICKÝ OBRAZ	21
2.4 PATOLOGIE	22
2.5 DIAGNOSTIKA	23
2.5.1 Koncentrace amyloidu- β ($A\beta$)	23
2.5.2 Koncentrace tau proteinu	24
2.6 LÉČBA.....	24
3 DEMENCE S LEWYHO TĚLÍSKY	25
3.1 KLINICKÝ OBRAZ	25
3.2 RIZIKOVÉ FAKTORY VZNIKU	25
3.3 DIAGNOSTIKA	25
3.4 LÉČBA.....	26
4 PARKINSONOVA DEMENCE	27
4.1 KLINICKÝ OBRAZ	27
4.2 PATOFYZIOLOGIE	27
4.3 RIZIKOVÉ FAKTORY VZNIKU	28
4.3.1 Genetické faktory	28
4.4 LÉČBA.....	28
5 VASKULÁRNÍ DEMENCE	30
5.1 KLINICKÝ OBRAZ	30
5.2 RIZIKOVÉ FAKTORY VZNIKU	30
5.3 DIAGNOSTIKA	30
5.4 LÉČBA.....	31
6 AMYOTROFICKÁ LATERÁLNÍ SKLEROZA	32
6.1 KLINICKÝ OBRAZ	32
6.2 PATOFYZIOLOGIE	32

6.3	DIAGNOSTIKA	33
6.4	LÉČBA.....	33
7	FRONTOTEMPORÁLNÍ LOBÁRNÍ DEMENCE	34
7.1	KLINICKÝ OBRAZ.....	34
7.2	DIAGNOSTIKA	34
7.3	LÉČBA.....	35
8	BIOMARKERY	36
9	AUTOPROTI LÁTKY	38
10	AUTOPROTI LÁTKY JAKO POTENCIÁLNÍ BIOMARKER U NEURODEGENACÍ	39
10.1	BIOMARKERY ALZHEIMEROVY CHOROBY A SROVNÁNÍ S JINÝMI DEMENCEMI.....	39
10.2	HODNOTY AUTOPROTI LÁTEK NEURODEGENERATIVNÍCH CHOROB	46
11	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
11.1	ELISA.....	48
12	METODIKA	50
12.1	VÝSLEDKY	53
13	ZÁVĚR.....	55
14	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56
15	PŘÍLOHY	71

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK

Obrázek 1: Makroskopické změny mozku vyskytující se při Alzheimerově chorobě.....	30
Obrázek 2: Neurofibrilární zámotky a amyloidní plaky.....	31
Obrázek 3: Lewy bodies tvořené α -synukleinem uvnitř neuronů.....	35
Obrázek 4: Dva nalezené typy TDP – 43 v motorické kůře a přední singulární kůře.....	44
Obrázek 5: Schematický nákres zobrazující místo exprese biomarkerů a lokalizaci patologických proteinových plaků.....	46
Obrázek 6: Schematické znázornění metody nepřímé ELISA.....	58
Tabulka 1: Hodnoty autoprotilátek neurodegenerativních onemocnění.....	55
Tabulka 2: Tab. 2: 96 jamková mikrotitrační destička se znázorněním napipetovaných koncentrací vzorků.....	61

SEZNAM ZKRATEK

acetyl-CoA	Acetyl koenzym A
ALS	Amyotrofická laterální skleroza
AMK	Aminokyseliny
AN	Alzheimerova choroba
ApoE4	Apolipoprotein E4
APP	Amyloidový prekurzorový protein
A β	Amyloid β
BIC	bicarbonate buffer
BSA	Bovine serum Albumin
CNS	Centrální nervový systém
CT	Computer tomography
DLT	Demence s Lewyho tělísky
DS	Downův syndrom
ELISA	The enzyme-linked immunosorbent assay
FTLD	Frontotemporální lobární demence
FUS	Fused in sarcoma
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
H ₂ SO ₄	kyselina sírová
HCl	kyselina chlorovodíková
HRP	Horseradish peroxidase
Chi3li	Chitinase-3-like protein 1
IgG	Imunoglobulin třídy G
IgM	Imunoglobulin třídy M
IVIG	intravénózní imunoglobuliny
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
MAG	Myelin-associated glycoprotein)
MBP	Myelin Basic Protein
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MKP	Mírná kognitivní porucha
MMM	Mozkomíšní mok
NaCO ₃	uhličitan sodný
NaHCO ₃	hydrogenuhličitan sodný

NaOH	hydroxid sodný
NfL	Neurofilament light chain
NfH	Neurofilament heavy chain
Ng	Neurogranin
OD	optická densita
PBS	Phosphate buffered Saline
PBST	PBS s detergentem Tween
PD	Parkinsonova demence
PET/MRI	Pozitronová emisní tomografie s magnetickou rezonancí
PLP	Proteolipid protein
PS-1 (2)	Presenilin 1 (2)
S100b	S100 calcium-binding protein B
Sod1	Superoxid dismutáza
SPECT	Single-Photon Emission Computed Tomography
TARDBP	TAR DNA-binding protein 43
TDP-43	Transactive response DNA – binding protein 43
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells-2
VD	Vaskulární demence
VSN-1	Visinin – like protein 1

TERMINOLOGIE

Acetylkoenzym A (acetyl-CoA) - látka účinná v metabolických reakcích, kde je výchozím metabolitem zejména pro β -oxidaci mastných kyselin a pro biosyntézu lipidů v těle. Je součástí citrátového cyklu, do něhož vstupuje a kondenzuje s oxalacetátem na citrát.

Amygdala - párová mozková struktura obratlovců, umístěna ve střední části spánkového laloku a jako součást Papezova emočního okruhu je propojena hojnými drahami do ostatních částí limbického systému a do mozkové kůry.

Astrocyty (či astroglie) - buňky patřící do skupiny neuroglií. Jsou to rozvětvené hvězdicovité podpůrné buňky s dlouhými výběžky.

Axon -výběžek nervové buňky (neuronu) sloužící jako informační výstup při přenosu informace mezi neurony nebo mezi neuronem a jinými buňkami (např. buňkami svalů).

Cytokin - označení pro skupinu menších signálních proteinů, účastnících se významně v imunitní odpovědi.

Hippocampus- část mozku ve spodní části mozku, součást limbického systému

Chromozom - specifická barvitelná buněčná struktura eukaryot přítomná v jádře. Skládá se z DNA a histonů.

Inhibitory acetylcholinesterázy – skupina látek různé chemické struktury inhibující acetylcholinesterázu. Zvyšují účinek působení acetylcholinu na synapsi.

Kognitivní – rozpoznávací, týkající se vnímání a myšlení

Memantin – derivát amantadinu s obdobným užitím jako antiparkinsonikum.

Mikrotubuly - jedny z vláken cytoskeletu, která slouží k transportu různých struktur a látek uvnitř buňky.

Neuroglie (gliové buňky, glie) - podpůrné buňky neuronů.

Neuron – nervová buňka, základní stavební a funkční jednotka nervového systému.

Neuroplasticita - vývoj změn v mozku v průběhu života

Nucleus Bazalis Meynerti – součást bazálních ganglií, které jsou součástí šedé hmoty koncového mozku zevně od thalamu. Vytváření a řízení pohyb, podílejí se také na kognitivních funkcích a funkcích limbického systému.

Temporální laloky (Spánkové laloky) - části mozkové kůry uloženy za spánkovou kostí a vnitřním uchem v obou mozkových hemisférách

(Augustinack et al., 2016; Vokurka et al., 2015).

ÚVOD

Každé tři vteřiny je ve světě diagnostikován nový případ demence. V roce 2015 to bylo 9,9 milionů nových případů a očekává se, že do roku 2050 to bude až 131,5 milionů dalších pacientů. Jsou to choroby, které významně ovlivňují kvalitu života pacienta a jeho rodiny a dříve či později končí smrtí. Přesto, že výdaje na léčbu a výzkum nových léků jsou obrovské, dosud všechny klinické testy zaměřené na léčbu těchto chorob měly 99,6% neúspěšnost. Je to především proto, že degenerace mozku začíná dávno předtím, než se začnou objevovat symptomy a neurologické poškození už může být v průběhu nemoci nevratné (Anderson, 2019).

Neurodegenerativní onemocnění patří do skupiny neurologických chorob, jejichž společným znakem je ztráta nervových buněk společně s charakteristickými nálezy proteinových ložisek v mozku. Mluví se proto o proteinopatiích. Proteinová ložiska jsou u většiny chorob tvořena bílkoviny amyloid- β , tau, α - synuklein nebo TDP - 43. Celosvětově nejrozšířenějším neurodegenerativním onemocněním je Alzheimerova choroba, která je také hlavní příčinou demence u 50-75 % pacientů s demencí. Také je to nemoc, u které byly výzkumy hledající spolehlivý diagnostický biomarker neúspěšnější. Kombinace snížené hodnoty amyloidu- β 42 v poměru s amyloidem- β 40 a zvýšené hodnoty fosforylovaného tau proteinu v mozkomíšním moku tvoří dnes už běžně využívané biomarkery pro průkaz Alzheimerovy choroby. Nicméně se stále nedaří nalézt biomarkery, které by dokázaly sledovat průběh AN a dalších neurodegenerací, výzkumy stále probíhají (Simrén et al., 2020).

Snaha výzkumných pracovníků je nalézt nejen spolehlivé biomarkery pro průkaz nemocí a jejich průběh, ale také vyvinout takovou diagnostickou metodu, která bude rychlá, levná, spolehlivá a co nejméně invazivní.

1 MÍRNÁ KOGNITIVNÍ PORUCHA

Mírná kognitivní porucha (dále jen MKP) představuje stav mezi normálním stárnutím a neurodegenerativním onemocněním, tedy stav, kdy jsou přítomny symptomy podobné demenci, ale ještě se nejedná o závažnější poškození mozku. Abychom mohli říct, že se jedná o MKP, je potřeba, aby byla splněna následující kritéria:

- kognitivní úpadek ve smyslu poškození paměti nebo pozornosti,
- potíže s vykonáváním běžných denních činností
- ale v zásadě normální fungování a absence demence (Roberts & Knopman, 2013).

Důvodem, proč je důležité diagnostikovat MKP správně, je to, že může (ale nemusí) přejít do jiné demence.

1.1 Klinický obraz

MKP se projevuje depresí, úzkostí, nepřátelským chováním a celkově sníženou kvalitou života a to hlavně tehdy, když si je pacient vědom svého onemocnění. Z neurobiologického hlediska dochází k atrofii temporálních laloků, především v hippocampu a entorhinálních částech a hypermetabolismu glukózy (Ashraf et al., 2015). Také dochází ke shlukování β -amyloidu do plaků kolem neuronů (hodnota Ab42 je v CSF snížena, což indikuje její větší koncentrace v mozku) a vytváření neurofibrilárních klubek, což připomíná neurologické nálezy u Alzheimerovy demence. Zvýšené hodnota celkového a fosforylovaného tau proteinu ukazují na neuronální poškození a předpovídají přechod MKP do AN).

Také přítomnost ApoE4 může být rizikovým faktorem pro vznik MKP, tak jako pro AN.

1.2 Diagnostika

Kromě výše zmíněných chemických biomarkerů, se k diagnostice využívají zobrazovací metody jako je PET/MRI, kde se posuzuje, zda je atrofie a ztenčení rhinálních kortexů společně s atrofií hippocampů větší než u běžného stárnutí (Anderson, 2019)

1.3 Léčba

K léčbě MKP se používají inhibitory cholinesteráz a lék memantin, v případě depresí také další léky na jejich zvládnutí. Doporučuje se také nefarmakologická léčba jako je cvičení pro podporu mobility a rovnováhy a stimulace paměti (Ströhle et al., 2015).

2 ALZHEIMEROVA CHOROBA

Azheimerova choroba (dále jen AN) je v současnosti nejrozšířenější neurodegenerativní onemocnění, které se projevuje kognitivními, behaviorálními a neuropsychologickými změnami, které zhoršují kvalitu života a ztěžují běžné každodenní činnosti.

AN je nejčastější příčinou demence, jejímiž příznaky jsou problémy s pamětí, myšlením, vyjadřováním, orientací v místě a čase, rozpoznáváním lidí či věcí a nakonec dochází ke změně osobnosti (Dubois et al., 2010). Je to onemocnění, které postihuje šedou kůru mozkovou a doba přežití je průměrně 9 let.

Demence je velmi rozšířený problém. Celosvětový počet lidí s demencí podle ADI (Alzheimer's Disease International) přesahuje 44 miliónů. Alzheimer Europe v roce 2009 odhadovala, že v ČR žije více než 123 000 lidí s demencí. V roce 2013 už u nás bylo podle stejných odhadů o 20 000 lidí s demencí více, tedy 143 000 (www.alzheimer.cz).

AN má tři stádia:

- preklinické, kdy má již pacient změny na mozku, ale choroba se ještě klinicky neprojevuje.
- Stadium mírné kognitivní poruchy, kdy je pacient ještě soběstačný, ale již vnímá některé poruchy. V tomto stadiu je snaha zjistit, zda jsou projevy demence příčinou budoucího rozvoje AN nebo jsou příčinou jiné formy demence, případně jiná onemocnění mozku.
- Stadium demence je konečné stadium při AN, kdy je pacient již nesoběstačný v důsledku velkého postižení mozku (Vyhnálek et al., 2012).

2.1 Dělení

Pokud se příznaky choroby začnou objevovat před 65. rokem života, hovoříme o familiární formě AN. Ta bývá zpravidla podmíněna geneticky, to znamená, že některou formou AN trpí i jiní členové pokrevního příbuzenstva. V takovém případě se zjišťují genetické faktory podmiňující onemocnění.

Druhá, podstatně častější, je forma, jejíž začátky začínají až po 65. roce a tu nazýváme sporadická forma AN. Senilní forma nemá genetické predispozice k onemocnění (Jiráček & Koukolík, 1998).

2.2 Rizikové faktory vzniku

Mezi známé rizikové faktory vzniku AN patří především věk, kdy riziko AN exponenciálně vzrůstá, největší incidence se udává po 85. roce života. Dále je to genetické zatížení, tedy AN nebo Downův syndrom v rodině, ženské pohlaví a nízké vzdělání. Další faktory, které způsobují neurodegeneraci mozku jsou tvorba amyloidu- β , degenerace tau-proteinu a přítomnost kyslíkových radikálů.

2.2.1 Autoprotilátky

Z nedávných výzkumů vyplynulo, že také imunitní systém hraje důležitou roli v patogenezi AN. U pacientů s AN a jinými demencemi byly totiž objeveny autoprotilátky proti různým molekulám, ačkoliv jejich role dosud nebyla úplně pochopena. Podle nedávných studií se ale ukázalo, že by mohly mít potenciál jako nové diagnostické biomarkery pro AN a další neurodegenerativní onemocnění (Wu & Li, 2016). Přehled konkrétních autoprotilátek bude rozebrán v kapitole 9 Autoprotilátky.

2.2.2 Genetické faktory

Jak již bylo řečeno, ke genetickým predispozicím patří také onemocnění Downovým syndromem. Je to z toho důvodu, že lidé trpící DS mají trisomii 21. chromozomu, na jehož raménku je umístěn gen, který kóduje amyloidový prekurzorový protein (Amyloid Precursor Protein, APP). Tito lidé mají tedy až 50% šanci, že po 50. roce onemocní AN (Head et al., 2012).

2.2.2.1 Amyloidový prekurzorový protein (APP)

Jak už název napovídá, APP je prekurzorový protein, ze kterého vzniká amyloid β . To je významný degenerativní protein, který tvoří základ tzv. alzheimerovských plaků.

APP se štěpí enzymem alfa - sekretázou a vznikají fragmenty o délce 40 aminokyselin. Předpokládá se, že se přispívají k neuroplasticitě mozku. Může se stát, že se APP štěpí β nebo γ -sekretázou. V takovém případě vznikají fragmenty o 42 (případně 43) AMK, které se shlukují a polymerují v nerozpustný β -amyloid. Ten se ukládá v části šedé hmoty mozkové, kde jsou nervová vlákna, výběžky gliových buněk a synapse a vznikají již zmíněné alzheimerovské (neuritické) plaky. V těchto oblastech dochází k neurodegeneraci a odumírání neuronů a sterilnímu zánětu (Zetterberg et al., 2010).

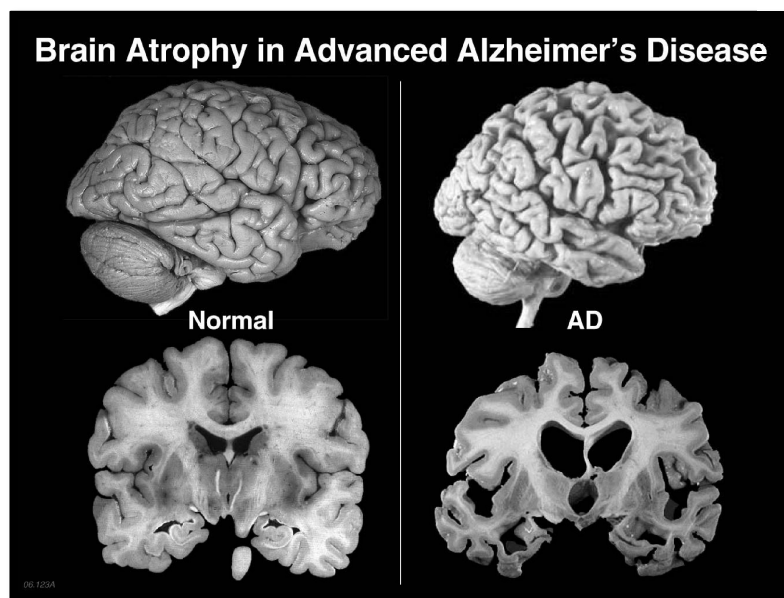
Bylo zjištěno, že toto patologické štěpení APP je u některých pacientů, zvláště u těch s familiárním typem nemoci, geneticky podmíněno na 14. a 1. chromosomu. Tam jsou geny označovány jako preseniliny. Konkrétně Presenilin 1 (PS-1) umístěný na chromosomu 14 a Presenilin 2 (PS-2) na chromosomu 1 (Zetterberg et al., 2010).

2.2.2.2 Apolipoprotein E4

Dalším genetickým faktorem je přítomnost apolipoproteinu E4 (ApoE4), přesněji izoformy ϵ_4 , který je produkován astrocyty v mozku. Předpokládá se, že přispívá ke koagulaci APP a tím vzniku plaků. APO E4 je kódován na chromozomu 19 (Rosenthal et al., 2018).

2.3 Klinický obraz

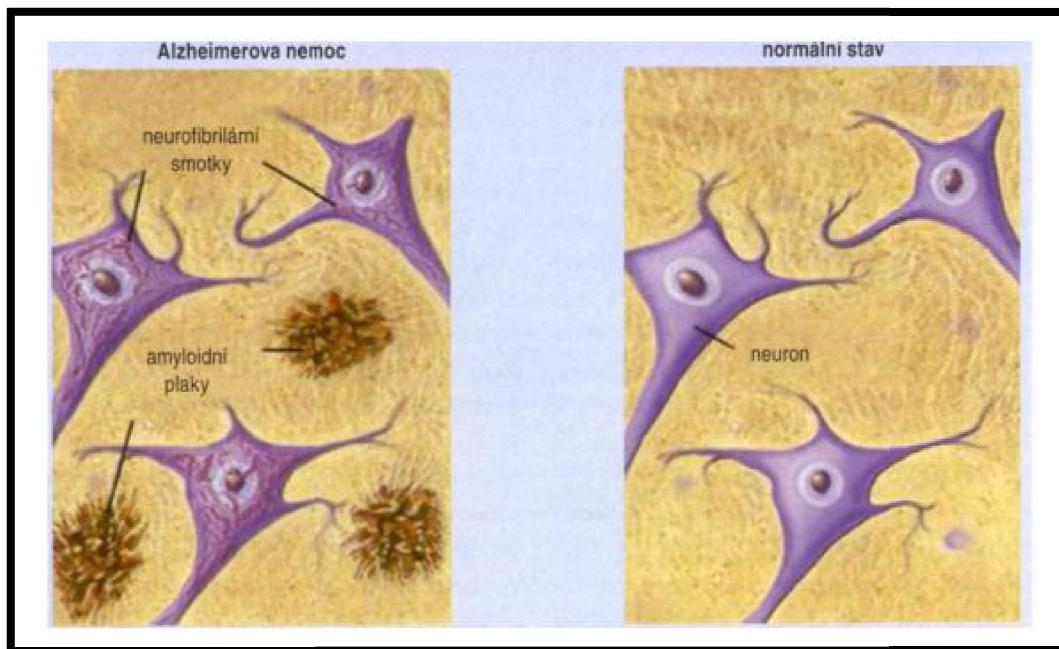
Z hlediska fyziologie jsou v průběhu Alzheimerovy choroby patrné makroskopické a mikroskopické změny. Na obrázku č. 1 můžeme vidět MRI zdravého a poškozeného mozku. U toho poškozeného je znát především zmenšení objemu mozku, hlavně vnitřních struktur spánkového laloku, hippocampu, entorhinální kůry a amygdaly. Také se rozšiřují mozkové komory a dochází k atrofii mozku (Bartos et al., 2019).



Obr 1: Makroskopické změny mozku při AN. Převzato z:

<https://www.brightstarcare.com/chattanooga/files/2013/11/alzheimers-scan.jpg>

Z mikroskopických změn jsou nejstudovanější tvorby amyloidních plaků a neurofibrilárních zámoťků (tangles), které můžeme vidět na obrázku č. 2. V důsledku toho dochází k degeneraci nervových vláken a vzniku nemoci.



Obr. 2: Srovnání mikroskopických změn v mozku pacienta s AN, neurofibrilární zámoťky a amyloidní plaky. Převezato z: https://www.nudz.cz/adcentrum/klinikcka_cast.html

2.4 Patologie

Při AN dochází k degeneraci a úbytku především cholinergních neuronů, postižen je hlavně jejich presynaptický oddíl. Jedná se o neurony, které projíkájí z Nucleus Bazalis Meynerti. Také ubývají presynaptické muskarinové a nikotinové receptory a snižuje se množství enzymu cholinacetyltransferázy, která syntetizuje acetylcholin z cholinu a acetyl-CoA. Naproti tomu acetylcholinesteráza, která odbourává acetylcholin, zůstává nezasažena.

Výše zmíněný amyloid- β , který vzniká rozkladem APP, se hromadí v mozkové tkáni. U pacientů s AN není tento protein dostatečně rychle rozkládán anebo je tvořen příliš a vznikají plaky. V místech těchto alzheimerovských plaků vzniká zánět, u kterého dochází k aktivaci mikroglíí i astrocytů. Také k uvolnění cytokinů a volných kyslíkových radikálů, které působí další degenerativní změny peroxidací lipidů buněčných membrán neuronů, které později zanikají (Chandoga et al., 2013).

Dalším proteinem, který se podílí na neurodegeneraci mozku, je tau protein. To je vysoce rozpustný protein běžně se vyskytující v neuronech, kde má za úkol stabilizovat

mikrotubuly, hlavně v axonech a tam také zprostředkovává optimální transport vzruchů (Pedersen & Sigurdsson, 2015). Je to také hlavní fosfoprotein v mozku a můžeme ho najít ve fosforylované a defosforylované formě. Nadměrnou fosforylací (hyperfosforylací) tau proteinu dochází ke změnám jeho molekuly, které potom vytvářejí párově helikální vlákna, ze kterých následně vznikají již zmiňované neurofibrilární zámotky (tangles) uvnitř neuronů (Chandoga et al., 2013).

Při AN také dochází k přílišnému vtoku vápníku do neuronů, což v konečném důsledku způsobuje zánik neuronů, protože dojde k destabilizaci jejich vnitřního prostředí. Dále se na rozvoji AN podílí poškození mitochondrií, snížená oxidace glukózy nebo nedostatek nervových růstových faktorů.

2.5 Diagnostika

Diagnostika onemocnění je důležitá, a to hlavně proto, aby se vyloučili jiné druhy demence, demence provázející stárnutí, případně mírná kognitivní porucha (MKP), která může a nemusí přejít v AN (Olsson et al., 2016). Také je nutné rozlišit, o které onemocnění se jedná, aby bylo léčeno správnými preparáty.

K diagnostice se využívají kognitivní testy, zobrazovací testy, jako jsou MRI a PET, a laboratorní diagnostika (Dubois et al., 2007). Mezi nejznámější laboratorní markery, které se v současné době využívají, patří hladina amyloidu- β , tau a fosforylovaného tau proteinu (Olsson et al., 2016).

2.5.1 Koncentrace amyloidu- β ($A\beta$)

Bohužel se ukázalo, že zrovna koncentrace amyloidu- β v plazmě není spolehlivý marker, který by měl prediktivní význam. Nebyly totiž nalezeny významné rozdíly mezi koncentrací $A\beta$ v plazmě u pacientů s preklinickou AN a u osob, které demencí netrpěli (Lövhem et al., 2016).

S koncentrací $A\beta$ v mozkomíšním moku je to ovšem jiné. Bylo totiž zjištěno, že tato hladina u pacientů s AN klesá oproti hladinám u stejně starých lidí, a to až o 50%. (Blennow et al., 2015). Ještě přesnější se zdá být určení poměru izoform $A\beta_{40}$: $A\beta_{42}$ v mozkomíšním moku. Tak lze také odlišit mírnou kognitivní poruchu, která se může vyvinout do AN od stabilní MKP (Olsson et al., 2016).

2.5.2 Koncentrace tau proteinu

Tau je protein, který podporuje sestavování tubulinu do mikrotubulů, jedné z hlavních složek neuronálního cytoskeletu, která definuje morfologii a poskytuje strukturální podporu neuronům (Kosik, 1993).

Jak již bylo zmíněno, tau protein se v plazmě nachází ve dvou formách, fosforylované a defosforylované. Bylo zjištěno, že u pacientů s AN je koncentrace tau proteinu v plazmě významně zvýšena v porovnání se skupinou lidí s vyloučenou demencí. Přesto, že tato hladina ukazuje pouze koncentraci celkového tau proteinu, je možné využít tento marker pro odlišení pacientů s AN nebo MKP od zdravých osob (Chiu et al., 2014).

Měření tau proteinu v likvoru dokonce ukázalo, že je ho možné využít jako marker pro predikci postupu MKP do AN (Andersson et al., 2008).

Pro zajištění likvoru je zapotřebí lumbální punkce, což je invazivní metoda. U obou výše zmíněných biomarkerů je možné lumbální punkci nahradit zobrazovacími metodami, které odhalí amyloidní plaky nebo neurofibrilární klubka v mozku.

2.6 Léčba

Pro léčbu AN zatím nebyly objeveny léky, které by spolehlivě onemocnění zastavily, současná léčba se soustředí na zpomalení neurodegenerativních změn, konkrétně se jedná o inhibitory cholinesteráz a antagonisty N-metyl aspartátových receptorů (Graham et al., 2017). Také probíhají výzkumy, které zkoumají vliv intravenózních imunoglobulinových produktů připravených z plazmy zdravých dárců jako potenciálních léků - IVIG (Hromadkova et al., 2015).

3 DEMENCE S LEWYHO TĚLÍSKY

Demence s Lewyho tělísky (dále jen DLT) je po AN druhou nejčastější neurodegenerativní chorobou. Ovlivňuje kognitivní chování, pohybové schopnosti a autonomní funkce. Je velmi podobná Parkinsonově chorobě, obě jsou to synukleinopatie, u kterých můžeme najít v mozcích pacientů charakteristická Lewyho tělíska v mozku. Liší se v časovém sledu příznaků, u PD se motorické příznaky objevují dříve než u DLT (Gomperts, 2016).

3.1 Klinický obraz

Lewyho tělíska a Lewyho neurity vznikají abnormálním ukládáním chybně složeného alfa-synukleinu a ubiquitinových agregátů v mozku, můžeme je vidět na obrázku č. 4. Projevuje se podobnými příznaky jako PD, ale dřívejším nástupem kognitivních dysfunkcí, zrakovými halucinacemi a poruchou chování v REM fázi spánku (Berman & Miller-Patterson, 2019).

3.2 Rizikové faktory vzniku

Hlavním rizikovým faktorem je věk, DLT představuje asi 5% všech případů demence u lidí starších 65 let. Dalším faktorem je mutace genů pro glukocerebrosidázy a a alfa-synuklein a H1 haplotyp MAPT (microtubule-associated protein tau). Jako rizikové faktory se neprojevily ani apolipoprotein E4 (Sezgin et al., 2019).

3.3 Diagnostika

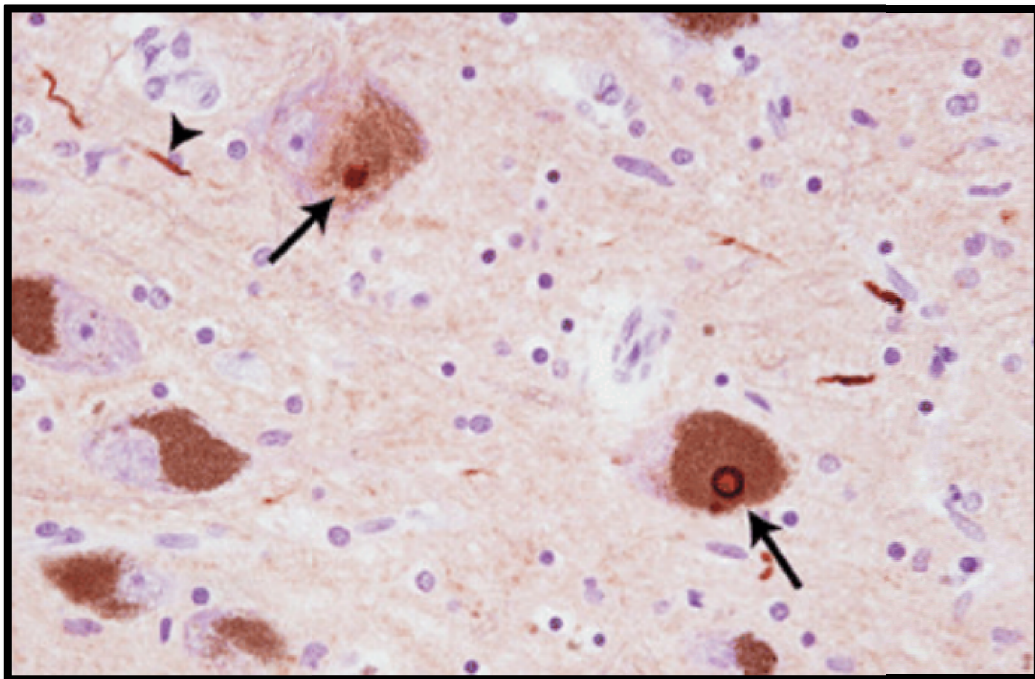
Diagnostika DLT zahrnuje jak zobrazovací metody, tak biochemické rozbory. MRI nebo CT může vyloučit jiné poškození mozku, které by mohlo ovlivňovat motorické a kognitivní funkce. Navíc, pokud se jedná o DLT, může být vidět atrofie parieto-occipitálního kortexu a striata nebo změny objemu v mozkovém kmeni.

PET sken ale může být pro diagnostiku DLT užitečnější, je to metabolická funkční metoda, která dokáže odhalit změněný metabolismus glukózy v mozku (Jellinger, 2018). DLT je považována za chorobu „mezi AN a PD“, symptomy všech nemocí jsou podobné, tak je někdy těžké odlišit jednu od druhé. Jako biomarkery se využívají stejné biomarkery jako pro diagnostiku AN a PD, tedy A β 1-42, celkový a fosforylovaný tau a alfa-

synuklein v MMM. Jako potenciální biomarker se uvažuje o neurofilamentech (Schade & Mollenhauer, 2014).

3.4 Léčba

DLT se stejně jako ostatní demence doposud nedá vyléčit, ale ke zmírnění příznaků se využívají inhibitory cholinesteráz, serotoninergní antidepresiva, antipsychotika a dopaminergní stimulanty (Palermo et al., 2018).



Obr. 3: Lewy bodies tvořené alfa – synukleinem uvnitř neuronů. Převzato z <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/what-is-dementia/types-of-dementia/lewy-body-dementia>

4 PARKINSONOVA DEMENCE

Parkinsonova demence (dále jen PD) je po Alzheimerově demenci třetí nejčastější neurodegenerací. Způsobuje zánik dopaminergních neuronů v substantia nigra. Nedostatek dopaminu v bazálních gangliích vede k poruchám hybnosti, které se projevuje i charakteristickým třesem tzv. extrapyramidovým parkinsonským syndromem (De Virgilio et al., 2016). Dalšími projevy mohou být také poruchy kognitivní nebo senzorické, například ztráta čichu (Roth et al., 1999).

Průměrný věk vzniku PD je okolo 60 let, ale zhruba 10 % pacientů onemocní již před 40. rokem věku.

4.1 Klinický obraz

Dle Braakovy teorie se dělí průběh onemocnění na 6 stadií. Preklinické 1. a 2. stadium se vyznačuje ztrátou sluchu a abnormálním chováním ve spánku. Ve 3. a 4. stadiu, kdy již dochází k postižení neuronů v substantia nigra a kdy poklesne dopamin pod 50% hranici normy, se objeví somatické příznaky, jako jsou bolesti kloubů a svalů a po čase dochází i k motorickým potížím. Objevuje se klidový třes, dochází ke zpomalení pohybů (bradykineze), omezení rozsahu pohybů (hypokineze) a startu pohybů (akineze). Dalšími typickými projevy jsou například zmenšení písma, strnulý výraz obličeje, řečové problémy nebo pomalá šouravá chůze. V pozdějších stadiích nemoci dochází k postižení vegetativního nervstva, psychickým problémům, zejména depresím, a poruchám kognitivních funkcí, což může vést až k demenci (Braak et al., 2002).

4.2 Patofyziologie

Typickým znakem pro Parkinsonovu chorobu z hlediska patofyziologie je ukládání a hromadění proteinu α - synukleinu ve formě Lewyho tělísek, podobně jako se to děje u AN, kde se hromadí amyloid- β a vznikají alzheimerovské plaky. Lewyho tělíška jsou považována za typickou známku zániku neuronů u PD. Vyskytují se ale i u jiných forem demence, typicky u demence s Lewyho tělísky, ale také v senilních placích u AN (Roth et al., 1999).

4.3 Rizikové faktory vzniku

4.3.1 Genetické faktory

Bylo identifikováno několik genů, které mutují bílkoviny zodpovědné za rozvoj familiární, ale u určitého procenta pacientů i sporadické formy Parkinsonovy nemoci.

Bílkoviny, které mají být z buňky odstraněny, jsou označeny ubiquitinem a následně degradovány v proteazomech. Zmutované geny způsobují to, že se bílkoviny špatně špatně skládají, shlukují se, a proto jejich odstraňování z neuronů vážne, proteiny se shlukují a vytváří inkluze. Příkladem je již zmiňovaný α - synuklein. Díky mutaci genu pro tuto bílkovinu vznikají α - synukleinové fibrily, které se hromadí v Lewyho tělískách, které jsou typické nejen pro PD, ale také pro demenci s Lewy bodies (DLT). Tuto agregaci podporuje také oxidativní stres (Davie, 2008).

Dalšími geny, které se uplatňují při mutacích bílkovin, jsou geny pro bílkovinu parkin. Ta nevytváří Lewyho tělíska ani jiné inkluze, ale také poškozuje ubiquitin – proteazomový komplex. Parkin je za normálních okolností protein, který zajišťuje odstraňování poškozených proteinů a také chrání neurony, protože zabráňuje rozkládání jejich funkčních částí (Ulmanová & Růžička, 2007).

Nejnovejším objevem je mutace genu pro enzym LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2), nazývaným také dardarin. Tato mutace byla objevena nejen u familiární formy nemoci, ale také u části pacientů se sporadickou formou nemoci. LRRK2 je běžný protein v mozku, který je exprimován v neuronech a zajišťuje správnou funkci neuronů regulací signálového přenosu. Jelikož se ukázalo, že mutace tohoto genu se spolupodílejí i na patogenezi tautopatií, uvažuje se, že terapie zaměřená na LRRK2 by mohla zpomalit, nebo snad úplně zastavit rozvoj neurodegenace (Gilks et al., 2005).

4.4 Léčba

V léčbě Parkinsonovy choroby byl za poslední léta učiněn obrovský pokrok. Nejúčinnějším lékem pro potlačování symptomů PD je Levodopa. Je to prekurzor dopaminu, doplňuje dopamin v bazálních gangliích. Proniká do mozku a tam je dekarboxylován na dopamin. Je ale spojena s významnými komplikacemi, jako je účinek „opotřebení“, dyskineze vyvolaná levodopou a další motorické komplikace.

Inhibitory katechol-o-methyl-transferázy, agonisté dopaminu a dopaminergní terapie jsou alternativní možnosti v léčbě PD a mohou být použity souběžně s levodopou. Neurochirurgická léčba se zaměřením na hlubokou stimulaci mozku je známá teprve krátce (Jankovic & Aguilar, 2008).

5 VASKULÁRNÍ DEMENCE

Vaskulární demence (dále jen VD) je neurodegenerace způsobená poškozením mozku infarkty. Postižení může být způsobeno trombozou, embolií nebo krvácením a postihuje hlavně malé tepénky v oblastech kognitivních funkcí, jako je thalamus nebo frontální oblast. Často se také objevuje společně s Alzheimerovou chorobou a tvoří asi 15 % všech demencí (O'Brien & Thomas, 2015).

5.1 Klinický obraz

Vaskulární demence je onemocnění, které poškozuje bílou hmotu mozkovou, způsobuje ztrátu myelinu, poškození axonů, mozkovou atrofii, včetně temporálního laloku. To způsobuje kognitivní dysfunkce podobné Alzheimerově chorobě (Kalaria, 2018).

5.2 Rizikové faktory vzniku

Největším rizikovým faktorem vzniku VD jsou cévní choroby pacienta, především opakující se mrtvice, nebo hypertenze, dále cukrovka, hyperlipidémie, kouření, fibrilace síní nebo metabolický syndrom nebo další stávající chronická onemocnění.

Také pokročilý věk je rizikovým faktorem, riziko exponenciálně vzrůstá po 65. roce života. Také úroveň vzdělání hraje roli v rozvoji VD. Bylo zjištěno, že vysokoškolské vzdělání je spojeno s menšími kognitivními deficity. Už ale nemá dopad na pokročilé onemocnění nebo rychlost progresu. Vzácně to mohou být genetické predispozice, jako jsou mutace genů pro různé vaskulopatie (Iadecola, 2013).

Dalším rizikovým faktorem může být tzv. mozková amyloidová angiopatie, což je stav, kdy se depozita peptidů β -amyloidu ukládají v mozkových cévách, žilách a kapilárách (Gorelick et al., 2016).

5.3 Diagnostika

Jelikož je vaskulární demence způsobena cévním poškozením mozku, předpokládá se, že po infarktech může dojít ke snížení kognitivních funkcí, případně až demence. Diagnostika zahrnuje využití zobrazovacích metod, kde by měly být vidět mozku nebo nitrolební krvácení zároveň s nástupem příznaků demence.

Laboratorní diagnostika zahrnuje testy běžné po prodělání mrtvice, ale pacientů, kteří mrtvici neprodělali, záleží výběr laboratorních markerů na jejich klinickém profilu a výsledcích zobrazovacích metod. Obecně ale zahrnují testy z krve, případně mozkomíšního moku, které se běžně používají pro zjištění demence (tedy Alzheimerovy choroby) v kombinaci s testy na vaskulární onemocnění a infekce. V případě genetické zátěže je možné udělat také genetické testy (Biessels, 2016).

5.4 Léčba

Léčba VD se zaměřuje na záchranu paměťových funkcí. Používají se látky, které podporují vytváření nových synapsí a udržují jejich spojení a léky, které léčí, nebo udržují vaskulární onemocnění (Sun, 2018).

6 AMYOTROFICKÁ LATERÁLNÍ SKLEROZA

Amyotrofická laterální skleroza, známá také jako Lou Gehrigova choroba (dále jen ALS), je smrtelné neurodegenerativní onemocnění, které je charakterizováno degenerací jak horních motoneuronů, tedy těch které projikují z mozkové kůry do mozkového kmene a míchy, a dolních motoneuronů, tedy těch, které vedou dále do svalů. Pacient trpí motorickými potížemi až atrofií svalů, později demencí a onemocnění končí smrtí (Hardiman et al., 2017).

Většina pacientů trpí sporadickou formou nemoci (sALS), pouze 10% případů je zděděných (familial – fALS). Tyto dvě formy se od sebe nijak neliší. V posledním desetiletí byly objeveny nové mutace genů pro familární formu ALS, z nichž nejznámější jsou mutace genů Sod1 (kodující superoxid dismutázu) a C9orf72 (TARDBP, kodující TAR DNA-binding protein 43) (Ferri & Coccurello, 2017).

6.1 Klinický obraz

Jak již bylo řečeno, ALS se projevuje motorickými potížemi. Začátek nemoci může být u pacientů různý, někteří pociťují svalovou slabost končetin, u některých se projevuje disartrií (problémy s řečí) a disfágií (problémy s polykáním). Následně se během rozvoje nemoci až u 50 % procent pacientů vyvinou problémy kognitivního charakteru a u 13% frontotemporální demence (Hardiman et al., 2017). Onemocnění také provází váhový úbytek, jak ze svalové hmoty, tak z tuku. V konečném stadiu nemoci pacient trpí svalovou atrofií, a je to právě atrofie dýchacích svalů která je příčinou úmrtí pacientů s ALS. Studie uvádí, že doba přežití je kolem 30 měsíců od začátku symptomů (Salameh et al., 2015).

6.2 Patofyziologie

V případě ALS se také jedná o proteinopatii, která způsobuje agregace proteinů kolem neuronů a tím jejich zánik. TDP - 43 je RNA vázající protein, který, spolu s ostatními stejně zaměřenými proteiny, určuje osud RNA transkript od jejich zrání až po degradaci. Jejich špatná funkce tedy může způsobovat defekty v metabolismu RNA. Kromě TDP-43 můžeme v agregátech najít také proteiny FUS nebo SOD1 (bude vysvětleno v kapitole 9 Autoprotilátky).

Také narušený ubiquitin - proteázomový systém hraje roli ve shlukování proteinů. ALS není onemocnění pouze neuronů, ale degenerace se týká také astrocytů, mikroglíí, makrofágů a oligodendrocytů (Oskarsson et al., 2018).

6.3 Diagnostika

Diagnostika ALS zahrnuje využití elektromyografie k vyšetření bioelektrických signálů ve svalech (Lenglet & Camdessanché, 2017). Jako biomarker pro laboratorní vyšetření se měří hladina již zmiňovaného proteinu TDP-43 v MMM, jehož hladina je v MMM významně zvýšena až u 95 % pacientů s ALS oproti zdravým kontrolám (Majumder et al., 2018).

6.4 Léčba

ALS je v současné době bohužel nevléčitelné onemocnění s krátkou dobou přežití. Jako podpůrná léčba se doporučuje cvičení, správná výživa a z farmakologického hlediska serotoninová léčba (Holecek & Rokyta, 2018).

7 FRONTOTEMPORÁLNÍ LOBÁRNÍ DEMENCE

Frontotemporální lobární demence (dále jen FTLD) je degenerativní onemocnění, které zasahuje především frontální a temporální laloky mozku. Narozdíl od předešlých chorob, FTLD začíná před 65. rokem věku, výjimečně už v 35 letech. Ve srovnání s AN je FTLD rychlejší z hlediska rozvoje poruchy kognitivních funkcí a také je kratší doba přežití pacienta (Sivasathiaselan et al., 2019).

7.1 Klinický obraz

Choroba má tři hlavní formy, behaviorálně-dysexekutivní varianta FTLD (impulzivní a neadekvátní chování, ztráta sociálního vnímání), non-fluentní progresivní afázie (progresivní expresivní afázie, potíže s vybavováním slov, gramatikou, psaním, čtením) a sémantická demence (problémy s pojmenováním slov a významu sdělení), které se od sebe liší klinickými projevy.

Na MRI nebo CT můžeme vidět atrofii nebo výraznou asymetrii frontálních a temporálních laloků a amygdaly, což vede ke ztrátě neuronů (Olney et al., 2017).

Z imunohistochemického pohledu mohou být FTLD tautopatie, ubiquitinopatie anebo FTLD bez specifického histologického obrazu, nebo onemocnění s neurofilamentózními okluzemi (Rektorová, 2006).

7.2 Diagnostika

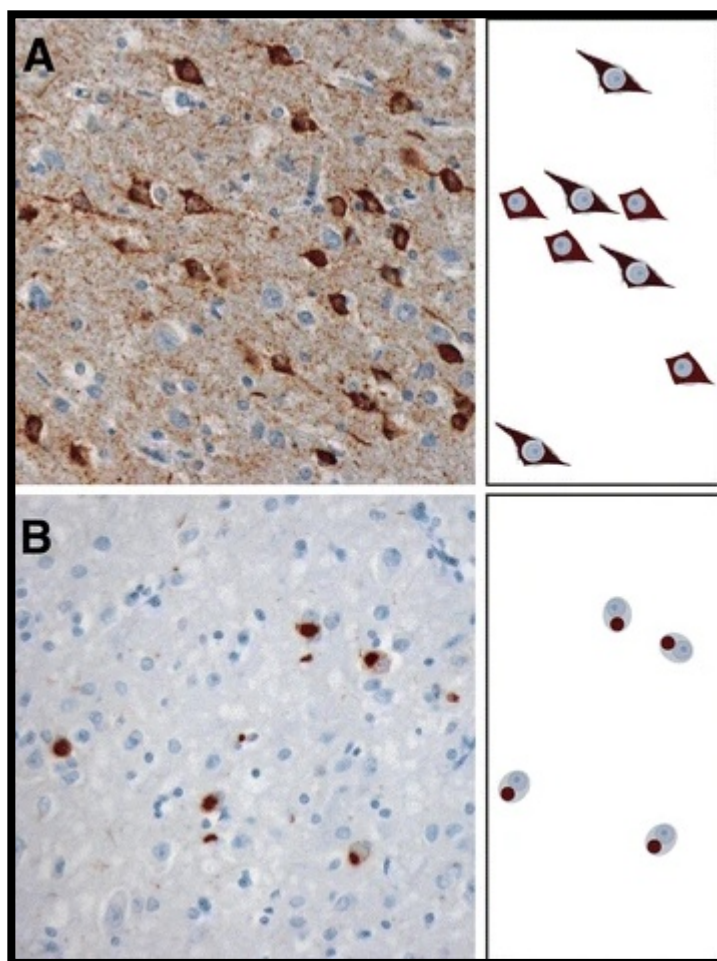
Pro potvrzení FTLD se využívají neuropsychologické testy, zobrazovací techniky jako je MRI, nebo PET nebo SPECT metabolické testy.

Také se testuje hodnota TDP-43, fosforylovaný tau protein a FUS. Toto jsou tři nejobvyklejší biomarkery, jejichž zvýšená hodnota v MMM poukazuje na onemocnění FTLD. Na obrázku č. 4 můžeme vidět, jak vypadají inkluze TDP – 43 v mozku pacienta s FTLD. Průměrně 20-30 % pacientů má tuto chorobu zděděnou z první linie příbuzenstva díky mutaci genu C9orf72 (TARDBP, kódující TAR DNA-binding protein 43, stejně jako u ALS) (Devenney et al., 2019).

7.3 Léčba

Dosud nebyla objevena žádná léčba pro FTLD. Doba přežití závisí na typu onemocnění a může to být pár let i desetiletí. Pacientům s tautopatií se podávají léky jako u AN, tedy inhibitory acetylcholinesterázy a memantin.

Těm, kteří nevykazují zvýšené hodnoty tau proteinu v MMM, se podávají serotonergní modulátory. Také neuroleptika pro zvládnutí psychoz, které onemocnění často provázejí. Ale jak se choroba rozvíjí, ke kognitivnímu úpadku se přidávají také neuromotorické potíže (Sivasathiaselan et al., 2019).



Obr. 4: Dva nalezené typy TDP – 43 lézí v motorické kůře a přední singulární kůře. Převzato z <https://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-017-0480>

8 BIOMARKERY

Biomarkery jsou charakterizovány jako jakékoliv látky, struktury nebo procesy, které mohou být objektivně změřeny v tělních tekutinách nebo tkáních a mohou být hodnoceny jako indikátor biologických a patogenních procesů nebo farmakologických odpovědí na léčbu. Biomarkery musí být dostatečně specifické a senzitivní pro dané onemocnění, aby se dalo usoudit na pozitivitu testu (Strimbu & Tavel, 2010).

Do současnosti bylo objeveno několik specifických biomarkerů pro výše uvedené neurodegenerativní onemocnění, které se více či méně využívají pro potvrzení onemocnění. Současné moderní výzkumy se snaží objevit nový biomarker nebo jejich kombinaci, který by odhalil neurodegenerativní onemocnění nejlépe ještě před jeho klinickou manifestací. Díky povědomí o tom, že proteiny vyskytující se u neurodegenerativních onemocnění působí v těle jako antigeny, lze využít k průkazu onemocnění protilátky proti těmto proteinům (autoprotiilátky). Tyto antigeny se exprimují v různých částech neuronů, jak můžeme vidět na obrázku č. 5.

Antigeny, které jsou zahrnuty v této práci, můžeme rozdělit na několik skupin:

1. Antigeny, které reflektují probíhající patologie u AN:

- Tau protein
- A β 40
- A β 42

2. Antigeny, které se využívají k diferenciální diagnostice nebo detekci smíšené demence:

- TDP-43 (Transactive response DNA – binding protein 43)
- α -synuklein
- FUS (Fused in sarcoma, RNA - binding protein)

3. Antigeny, které reflektují degeneraci dendritu (axonu):

- VSN-1 (Visinin – like protein 1)
- NfL a NfH (Neurofilament light chain a Neurofilament heavy chain)

4. Antigeny, které reflektují mikrogliaální a astrocytární aktivaci

- TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells-2)
- MBP (Myelin Basic Protein)
- GFAP (Glial fibrillary acidic protein)
- Chi3li (CHI3LI encoding the inflammatory glycoprotein YKL-40)

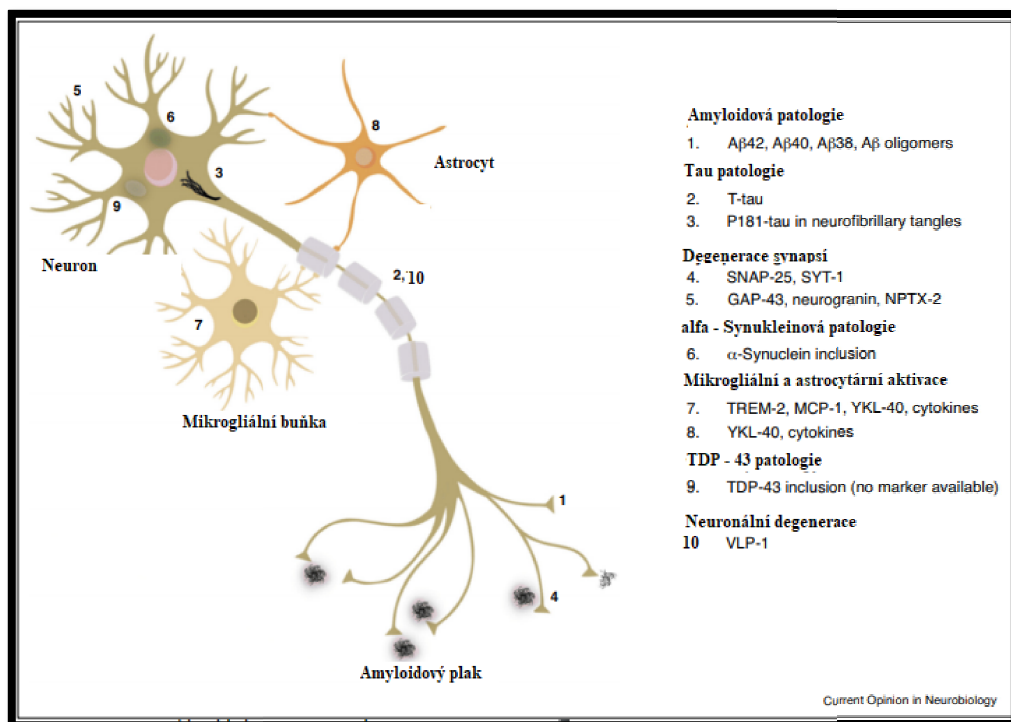
- S100b (S100 calcium-binding protein B)
- MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)

5. Antigeny, které odrážejí ztrátu synapsí

- Ng (Neurogranin)*

K detekci protilátek se využívá metody ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), jejíž postup bude popsán později v kapitole 11.1 ELISA.

* (Dhiman et al., 2019), (Zetterberg, 2017), (Lashley et al., 2018), (Zhang et al., 2018).



Obr. 5: Schematický náčrt zobrazující místo exprese biomarkerů a lokalizaci patologických proteinových plaků. Převzato od Simrén et al., 2020.

9 AUTOPROTILÁTKY

Autoprotilátky jsou imunoglobuliny, které mohou být produkovány za fyziologických a patofyziologických podmínek. Fyziologicky tělo produkuje autoprotilátky, které rozpoznávají autoantigeny. Jsou to protilátky, často třídy IgM, které jsou produkovány spontánně v průběhu vývoje B buněk. Jejich účelem je fagocytóza apoptických buněk a inhibice zánětlivých procesů. Za normálních okolností jsou přirozeně se vyskytující autoprotilátky málo afinitní k vlastním antigenům. Produkce vysoce afinitních autoprotilátek, především z třídy IgG, je stimulována záněty a infekcemi, které spouští afinitní vyzrání protilátek do stavu, kdy reagují s vlastními antigeny. Zhroucení imunitní tolerance je hlavní důvod, který vede k patogenní produkci autoprotilátek a autoimunitním onemocněním.

Tím, že se patogenní autoprotilátky navážou na vlastní antigeny s vysokou afinitou, spustí zánětlivý proces. Alzheimerova choroba a ostatní demence mohou být také typem autoimunitního onemocnění, protože, jak už bylo uvedeno výše, u pacientů s neurodegenerativními onemocněními byly detekovány protilátky proti vlastním antigenům. Některé z nich se mohou podílet na rozvoji onemocnění, některé naopak mohou zmírňovat jeho průběh (Wu & Li, 2016).

10 AUTOPROTILÁTKY JAKO POTENCIÁLNÍ BIOMARKER U NEURODEGENACÍ

10.1 BIOMARKERY ALZHEIMEROVY CHOROBY A SROVNÁNÍ S JINÝMI DEMENCEMI

a) antigeny, proti kterým byly objeveny protilátky

Jak již bylo uvedeno, u pacientů s AN byly objeveny dva hlavní znaky, podle kterých usuzujeme na onemocnění AN, a to Alzheimerovské plaky tvořené proteinem β -amyloidem a neurofibrilární zámoťky, tvořené tau proteinem. Tyto také slouží jako dva hlavní biomarkery pro diagnostiku AN. Jejich hladiny můžeme najít v mozkomíšním moku, kde hodnoty celkového a specificky fosforylovaného proteinu tau jsou zvýšené a naopak jsou sniženy hladiny β -amyloidu (de Souza et al., 2012).

Podle několika studií byly prokázány autoprottilátky proti tau proteinu a β -amyloidu, a to jak v krvi, tak v mozkomíšním moku (Bartos et al., 2012). Jedná se konkrétně o zvýšenou hladinu autoprottilátek proti peptidu β -amyloidu 1-42 a fragmentu 25-35 a jeho oligomerům. Tyto autoprottilátky se jeví jako spolehlivý biomarker pro detekci AN (Maftai et al., 2013). Stejně jako autoprottilátky proti tau proteinu, které se navazují na jeho fragmenty obsahující domény vázající mikrotubuly a také fosforylované formy tau-proteinu jako jsou pT181, pT231, pS235, pS202 a pS209 (Pascual et al., 2017).

Autoprottilátky proti tau proteinu a amyloidu- β jsou však detekovány a spojeny i s dalšími demencemi jako jsou FTLD a DLT. Avšak jejich hladiny se liší ve srovnání s AN, navíc mají tyto demence další specifické markery (Maetzler et al., 2011).

Oba výše zmíněné biomarkery jsou vhodné pro diagnostiku bezprostředního výskytu AN, ale mají nízkou prognostickou hodnotu, pokud jde o snižování kognitivních funkcí. A proto je snaha nalézt další biomarkery, které by toto splňovaly. A protože ztráta mozkových synapsí mnohem lépe odpovídá kognitivnímu úpadku, zkoumá se například protein neurogranin.

S100b (S100 calcium-binding protein B) je gliální protein, který je exprimován hlavně na astrocytech aktivovaných v mozku pacientů s AN. Jako všechny gliální buňky

je součástí periferního nervového systému, který neprodukuje elektrické impulzy. Zajišťuje homeostázu a chrání neurony. Proto je zvýšení jeho hladin v mozkomíšním moku znakem degenerace neuronů (nebo zranění mozku), čehož se může využít jako biomarkeru (Thelin et al., 2017).

Hladiny tohoto proteinu kolísají v průběhu rozvoje demence a autoprotilátky proti němu indikují rozvíjející se neurodegeneraci. Tyto autoprotilátky se však objevují i u vaskulární demence, kde jsou jejich hladiny ještě vyšší (Steiner et al., 2011).

Dalším antigenem, proti němuž můžeme najít v mozkomíšním moku autoprotilátky, je **GFAP** (Glial fibrillary acidic protein). To je protein, který je exprimován na mnoha buňkách v CNS. V astrocytech je jedním z hlavních proteinů, který tvoří gliální vlákna. Je důležitý pro správnou funkci CNS i hematoencefalické bariéry. Autoprotilátky proti GFAP vykazují vyšší hladiny u AD než u kontrolních vzorků a tyto hladiny ještě vzrůstají u pacientů s vaskulární demencí (Mecocci et al., 1995).

Cytoplazmatické inkluze proteinu TDP-43 jsou charakteristické pro ALS. V plazmě pacientů byly nalezeny zvýšené hladiny proteinu TDP-43 v porovnání s kontrolami (Suárez-Calvet et al., 2014). Navíc byly prokázány zvýšené hladiny NFL (neurofilament light) v krvi ALS pacientů oproti kontrolám (Weydt et al., 2016).

Parkinsonova nemoc (PD) stejně jako demence s Lewy bodies (DLT) jsou spojovány s ukládáním agregovaného proteinu α -synukleinu ve formě tzv. Lewy bodies. **α - synuklein** je presynaptická bílkovina, která je významná v celé řadě neuronálních procesů, hlavně v synaptickém přenosu a ovlivňuje synaptickou plasticitu. Tvoří asi 1 % všech proteinů v CNS a je exprimován v neuronech v terminální presynaptické oblasti axonu, neokortexu, hippokampu, substantia nigra i gliových buňkách. Ovlivňuje metabolismus dopaminu interakcí s tyrosinhydroxylasou, která se nemůže hydrolyzovat a důsledkem toho se snižuje tvorba dopaminu. Ukládání α -synukleinu je základem chorob souhrně nazývanými synukleinopatie (Stefanis, 2012).

PD a DLT je často složité odlišit, protože i u Parkinsonovy nemoci dochází po motorických problémech k rozvoji demence. Hladiny celkového α -synukleinu v mozkomíšním moku jsou u pacientů s PD snižené oproti kontrolním subjektům a ve srovnání s AN (Gao et al., 2015); Naopak hladiny oligomerů α -synukleinu jsou v MMM zvýšené jak u PD, tak u demence s Lewy bodies (DLT) ve srovnání s AN a kontrolami

(Hansson et al., 2014). Autoprotilátky proti α -synukleinu byly nalezeny jak u pacientů s PN, tak s DLT (Koehler et al., 2013). Ukazuje se, že jejich hladiny nejsou v průběhu onemocnění stabilní a nejvyšší titry lze měřit u pacientů s méně než 4 lety trvání PD (Smith et al., 2012).

V patologii PD se uplatňují rovněž gliové buňky. Byly nalezeny autoprotiátky proti antigenům MAG (myelin-associated glycoprotein), MBP (myelin basic protein) a PLP (proteolipoprotein) u pacientů s PN (Papuć et al., 2014).

MAG (Myelin-associated glycoprotein) je transmembránový glykoprotein lokalizovaný na Schwannových buňkách a membránách oligodendrocytů. Je zodpovědný za interakci mezi gliovými a buňkami a axony a také za myelinizaci během neurální regenerace v periferním nervovém systému. V centrálním nervovém systému naopak inhibuje neuroregeneraci (Quarles, 2007).

MBP (Myelin basic protein) je druhý nejvíce zastoupený protein v myelinu centrální nervové soustavy. Reaguje s řadou polyaniontových proteinů a záporně nabitých lipidů a při vazbě na ně získává strukturu. Také působí jako protein vázající membránový aktin, čímž se účastní přenosu extracelulárních signálů do cytoskeletu v oligodendrocytech a tight junctions v myelinu (Boggs, 2006).

PLP (proteolipid protein) je nejčastějším membránovým proteinem v myelinu centrální nervové soustavy. Je důležitý pro zrání a stabilitu myelinu a axonů (Greer & Lees, 2002).

U anti-MAG autoprotiátek byla charakteristická zvýšená hladina oproti kontrolám a následující klesající trend v opakovaných měřeních po dobu jednoho roku. Oproti tomu hladiny autoprotiátek proti MBP a PLP se s časem zvyšovaly (Papuć et al., 2014).

Pacienti s PD a DLT mohou rovněž vykazovat amyloid- β patogenezi s nálezem amyloidních plaků (Jendroska et al., 1997). Pacienti bez projevů demence a s depozity β -amyloidu prokazovali rychlejší nástup kognitivního deficitu, než pacienti bez β -amyloid patologie. (Alves et al., 2014). Měření autoprotiátek a porovnání jejich hladin u PD a DLT může sloužit jako slibný biomarker pro rozlišení těchto dvou nemocí a v případě měření hladin autoprotiátek proti gliovým markerům rovněž pro sledování rozvoje onemocnění.

Společný biomarker neurodegenerativních onemocnění jako je NfL, by rovněž mohl pomoci v diferenciální diagnostice. NfL (Neurofilament light chain) je neuronální cytoplazmatický protein, který je vysoce exprimován v axonech. Je jedním z nejslibnějších biomarkerů, protože jeho hladiny se zvyšují jak v mozkomíšním moku, tak v krvi úměrně stupni poškození axonů u řady neurodegenerativních onemocnění. Díky novým imunologickým metodám, které jsou schopné detekovat velmi nízké hladiny Nfl, je možné snadno a opakovaně sledovat průběh nemoci (Gaetani et al., 2019).

Bartoš et al. popsali protilátky proti Nfl v séru u pacientů s AN. Jejich hodnoty byly stejné jako u kontrolních zdravých jedinců, ale také objevil protilátky proti NfH (Neurofilament heavy chain), které byly oproti kontrolám snižené (Bartoš et al., 2018).

Zvýšené hladiny NfL byly zaznamenány v MMM pacientů s ALS, ale také u pacientů s AN a VD, kde byl ovšem nárůst nižší. NfL bylo měřeno také u pacientů s PD (Magdalinou et al., 2015), přičemž nedávná studie potvrdila schopnost rozlišit PD od atypických parkinsonských syndromů (Hansson et al., 2017), a FTLD (Rohrer et al., 2016). Bacioglu et al. (2016) měřili hladiny NfL v MMM a plazmě myšího modelu různých proteinopatií – tautopatie, amyloidopatie a synukleinopatie, s cílem jejich porovnání. MMM i plazmatické hladiny NfL byly zvýšené 10-20x u modelu tautopatie a amyloidopatie, přičemž model synukleinopatie vykazoval 1000x vyšší hladiny oproti kontrolám (Bacioglu et al., 2016).

b) antigeny, proti kterým zatím protilátky nebyly objeveny, ale slouží jako biomarker sami o sobě

Neurogranin je postsynaptický protein, který je zodpovědný za schopnost učení, hlavně prostřednictvím vazby na kalmodulin (De Vos et al., 2015). Podílí se na potenciaci a synaptické plasticitě a zvýšená koncentrace v MMM u pacientů s AN předpovídá přechod MKP do AN. Bylo zjištěno, že neurogranin se výrazně zvyšuje v MMM rychle po akumulaci β -amyloidu, což podporuje myšlenku, že ke ztrátě synapsí dochází u AN pacientů brzy po propuknutí nemoci a že je tedy neurogranin dobrým biomarkerem pro sledování úbytku synapsí (Simrén et al., 2020).

Hladina neurograninu je u pacientů s AN zvýšena, oproti hladinám u pacientů s FTLD, DLT a PD (Janelidze et al., 2016). Také by mohl sloužit jako marker konverze MKP v AN (Kvartsberg et al., 2015).

Kolem 50 % FTLD případů je charakterizováno výskytem zkrácených a fosforylovaných forem proteinu **TDP-43** (transactive response DNA-binding protein 43; FTLD-TDP podtyp). TDP-43 je protein, který se váže na RNA a reguluje sestřih, translaci, transport a dokonce degradaci mRNA. V souvislosti s neurodegenerativními onemocněními je TDP-43 protein, který se u lidí váže na mRNA neurofilamentu s nízkou molekulovou hmotností a je responsivním faktorem na neuronální aktivitu v dendritech hippokampálních neuronů, a může být tedy zodpovědný za regulaci stability mRNA a lokální translaci v neuronech (Gao et al., 2018).

Ve 45 % FTLD případů byl prokázán výskyt agregátů proteinu tau (FTLD-tau podtyp) (Goossens et al., 2015). Jak protein tau, tak TDP-43 byly detekovány v plasmě/séru pacientů s AN a FTLD-TDP (Zetterberg et al., 2013). U FTLD-TDP zatím výskyt autoprotilátek ohlášen nebyl, ale dá se spekulovat, že by mohly být v krvi přítomné vzhledem k výskytu TDP-43 proteinu v plazmě FTLD-TDP pacientů.

Kromě tau a TDP-43, by mohl být vhodným antigenem pro detekci autoprotilátek protein **FUS** (RNA-binding protein FUS, Fused in sarcoma). FUS je protein vázající RNA/DNA a podílí se na různých buněčných procesech, včetně transkripce a regulace genů, opravy DNA a udržování genomické stability. Může se tedy stát, že FUS sekvestruje důležité regulátory nebo spustí abnormální signální dráhy vedoucí ke změně fyziologie buněk. Anebo agregace FUS proteinu „vyčerpají“ funkční FUS, což může způsobit nestabilitu mRNA a spustit imunitní odpověď, jako je zánět, což má za následek další poškození neuronů. Vyčerpání funkčního FUS vede k neurodegenerativnímu onemocnění (Chen et al., 2019).

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1, nazývaný také chemokine ligand 2 - CCL2) je důležitým chemoatraktantem pro mikroglie a lymfocyty. Je to malý cytokin, který patří do tzv. C-C chemokinních receptorů. Vysílá monocyty, paměťové T buňky a dendritické buňky na místa zánětu (Yao & Tsirka, 2014). Slouží jako biomarker neurodegenerativních onemocnění, kdy reflektuje gliální aktivaci a neurální zánět (Simrén et al., 2020).

VSN-1 (Visinin like protein 1) je nově objevený marker, který indikuje poškození neuronů a mikroglální aktivaci. Podílí se synaptické plasticitě a vytváření paměti. Je to protein, který spolu s dalšími udržuje homeostázu vápníku nervového systému. Poškozená homeostáza vápníku je totiž jedním z patofyziologických rysů AN (Grolewska et al., 2015).

Mnoho studií se snažilo porovnat hladinu VSN-1 v MMM u pacientů s AN se zdravými kontrolami a pacienty s MKP. Přesto, že hladiny VSN-1 jsou u pacientů s AN a MKP vyšší než u kontrol, zatím (2017) se nepotvrdilo, že by hladiny samotného antigenu VSN-1 v MMM nějak významně odlišovali AN pacienty od těch s MKP (Hu et al., 2017).

TREM2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2) – je protein, specifický tím, že je exprimován výhradně na buňkách imunitního systému, kterými jsou dendritické buňky, granulocyty, buňky kostní dřeně, makrofágy, Kupfferovy buňky, alveolární makrofágy a osteoklasty. To by mohlo naznačovat, že imunitní systém hraje významnou roli v patogenezi AN a dalších neurodegenerací.

Nedávné studie (2017) ale ukázaly, že exprese TREM2 je u zánětlivých procesů zvýšena a také, že rozpustný TREM2 je v mozku pacientů s AN produkován v závislosti na progresi onemocnění, což z něj činí slibný marker pro zjištění rozvoje onemocnění. Ukázalo se totiž, že TREM2 je výrazně zvýšen v MMM u pacientů s MKP, raných stádiích AN a ALS, v porovnání se zdravými kontrolami a AN pacienty.

U těch se také zjistilo, že hladiny TREM2 odpovídají hladinám celkového a fosforylovaného proteinu tau v MMM, ale neodpovídají změnám hladin amyloidu- β nebo ApoE4 (Jay et al., 2017).

Nedávný objev ukázal, že genetická varianta R47H TREM2 zvyšuje riziko AN asi trojnásobně, podobně jako riziko, které udělujeme genetické mutaci APOE4. V myších AN modelech deficit TREM2 snižoval mikroglální odpověď na vytváření plaků z amyloidu- β , bylo sníženo množství mikroglálních buněk obklopujících plaky a zhoršila se aktivace exprese mikroglálních genů.

Fosfolipidy a lipoproteiny (včetně APOE) byly identifikovány jako ligandy pro TREM2. Varianta R47H TREM2 narušuje schopnost TREM2 vázat ligandy, fagocytózu mikroglie a transkripční odezvu (Yeh et al., 2017).

CHI3L1 (chitinase-3-like protein 1 nebo také YKL-40) je glykoprotein, který je exprimován a sekretován buňkami imunitního systému (a buňkách odvozených z monocytu) při zánětu, imunitních onemocněních nebo karcinogenezi. Zatím je jeho role v patogenezi neurodegenerativních onemocněních nejasná. Patří ale do rodiny chitináz, což jsou enzymy, které katalyzují hydrolýzu chitinu. CHI3L1 postrádá chitinázovou aktivitu kvůli mutacím. Ukázalo se, že se účastní přeměny cytoskeletu během zrání monocytu a jeho aktivace (Yeo et al., 2019).

Amyloidové plaky v mozku AN pacientů mohou indukovat aktivaci mikroglíí, které spouští syntézu prozánětlivých mediátorů. To vede ke zvýšené expresi CHI3L1 v astrocytech. Studie prokázali, že hladina tohoto glykoproteinu je zvýšena u pacientů s AN ve srovnání se zdravými jedinci. Navíc tato hladina korelovala s hodnotami proteinu tau a amyloidu- β .

Zajímavé je, že bylo zjištěno, že exprese CHI3L1 je závislá také na pohlaví pacienta, nejvíce zvýšená je u žen nad 65 let s AN v porovnání s ostatními kontrolními skupinami (muži zdraví i s AN, mladší ženy). Hladina také s ještě vyšším věkem klesá a rozdíl u exprese zase mizí, pravděpodobně vlivem snižování pohlavních hormonů.

CHI3L1 je zatím jako nový biomarker v MMM pro Alzheimerovu chorobu zkoumán (Sanfilippo et al., 2019).

Proběhly ale studie, které porovnávaly hodnoty fosforylovaného tau, VSN-1 a CHI3L1, jejichž cílem bylo zjistit, zda kombinace těchto tří biomarkerů může zpřesnit diagnostiku AN a MKP a také, jestli nalezené hodnoty odpovídají amyloid- β patologii a ostatním AN znakům, jako je snižování kognitivních funkcí nebo atrofie mozku. Zvýšené hodnoty jak VSN-1, tak CHI3L1 můžou ukazovat na degenerativní onemocnění (Zhang et al., 2018). Také hodnoty TREM2 v MMM korelovaly s CHI3L1 (Jay et al., 2017).

10.2 HODNOTY AUTOPROTILÁTEK NEURODEGENERATIVNÍCH CHOROB

Zde uvádíme tabulku, která shrnuje výše uvedené dosud objevené hodnoty autoprotilátek u jednotlivých demencí v MMM. Otazník v buňkách znamená, že autoprotilátky ještě nebyly popsány v dostupné literatuře.

Tab. 1: Hodnoty autoprotilátek neurodegenerativních onemocnění

	NEURODEGENERATIVNÍ CHOROBY					
PROTILÁTKY PROTI	MKP	AN	FTLD	PD	DLB	VD
Aβ42	?	↓ nebo stejná hodnota	?	↑	↑	?
Aβ40	?	?	?	?	?	?
Tau protein	↑ (záleží na pohlaví)	↓ nebo stejná hodnota	?	↓ než kognitivně normální	?	?
α-synuclein	?	↑	↑(>PD)	↑, ↓ nebo stejná hodnota	↑	?
FUS	?	?	?	?	?	?
VSN-1	?	?	?	?	?	?
NFL	?	Stejná hodnota v plazmě a séru	?	?	?	?
TREM2	?	?	?	?	?	?
MBP	?	↑	↑	↑	↑	?
GFAP	?	↑	?	Stejná	?	↑

				hodnota		
Chi3li	?	?	?	?	?	?
S100b	?	↑	?	Stejná hodnota	↑	↑
MCP-1	?	?	?	?	?	?
Neurogranin	?	?	?	?	?	?

11 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části v této práci je provedení a vyhodnocení výsledků, které jsme prováděli v laboratořích Národního ústavu duševního zdraví ve spolupráci se společností Vidia spol. s.r.o. sídlící ve Vestci.

Cílem spolupráce je snaha vyvinout spolehlivou diagnostickou metodu, která by dokázala jednoduchými imunologickými testy odhalit některé z neurodegenerativních onemocnění.

Jako vzorky jsme použili reálné plazmy a séra pacientů s různými neurodegeneracemi, které má NÚDZ k dispozici pro výzkumné účely.

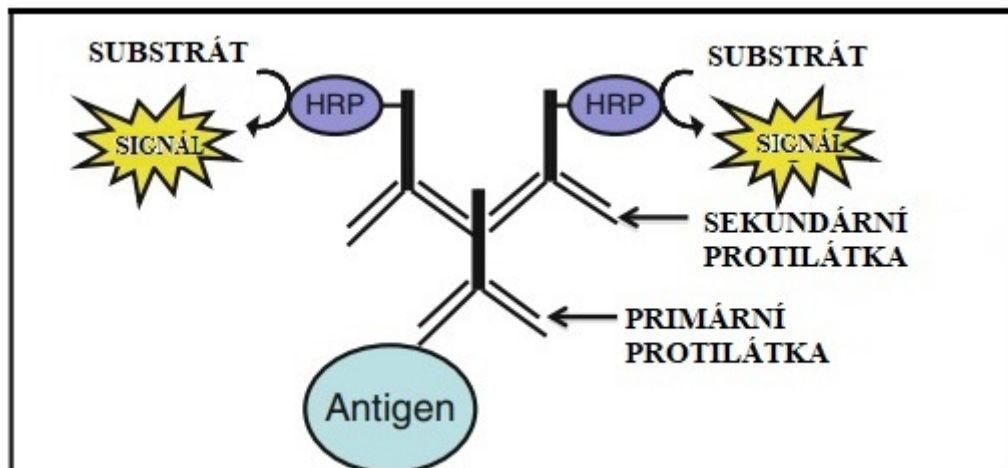
11.1 ELISA

Pro analýzu protilátek jsme použili metodu nepřímé ELISA. ELISA (The enzyme-linked immunosorbent assay) je jednoduchá a rychlá technika pro detekci a kvantifikaci protilátek nebo antigenů, které jsou navázány na povrch pevné látky, většinou mikrotitrační destičky. Tato technika má několik variant, jedná se o přímou (pro průkaz antigenů) a nepřímou ELISA, sandwichová (pro průkaz protilátek) a kompetitivní ELISA (pro průkaz protilátek a antigenů) (Aydin, 2015).

Principem této metody je vysoce specifická reakce antigenu a protilátky. U nepřímé ELISA, kterou jsme použili my, se vzorek s hledaným antigenem napipetuje do 96 jamkové mikrotitrační destičky a antigen se naváže na její povrch. Poté se přidá blokovací roztok, aby se zaplnila všechna nenavázaná místa v jamce. Potom se destička promyje, aby se odstranily nenavázané antigeny. Přidá se primární látka a destička se nechá inkubovat a dochází k reakci antigenu a protilátky. Poté se opět promyje a odstraní se nenavázaná protilátka. Přidá se sekundární protilátka značená enzymem, která reaguje s primární protilátkou a po inkubaci se destička opět promyje. Přidá se substrát, který reaguje s enzymem a nakonec se přidá roztok na zastavení enzymatické reakce. Výsledkem je barevná změna, jejíž intenzita se měří spektrofotometricky při 400 - 600nm (Lin, 2015). Schematický nákres principu ELISA můžeme vidět na obrázku č. 6.

Jako primární látka se používá neoznačený imunoglobulin nebo sérum, které jsou specifické proti hledanému antigenu. Sekundární protilátka je protilátka proti Fc-fragmentu imunoglobulinů zvířete, ze kterého byla vytvořena primární protilátka. V případě nepřímé ELISA je značena enzymem, který reaguje se substrátem.

Enzym, kterým jsou značeny sekundární protilátky, které používáme v našich experimentech, je křenuv peroxidáza (HRP, horseradish peroxidase). HRP katalyzuje přenos elektronů z peroxidu vodíku na akceptor (v našem případě TMB) a oxidací vzniká barevný produkt, jehož intenzita se měří na spektrofotometru (Beranová & Tonar, 2012.).



Obr. č. 6: Schematické znázornění metody nepřímé ELISA. Převzato a upraveno z:

<https://www.nordicbiosite.com/blog/elisa-principles-101>

12 METODIKA

K experimentům jsme používali následující pomůcky:

Materiál:

- 96 jamkové mikrotitrační destičky P Gama plate,
- Antigeny: antiTau – vyizolováno z Flebogamma DIF, LOT A4GDB00341
 - GFAP - Antibodies online, LOT ABIN368852
 - S100b – abcam, LOT ab82734
 - TDP – 43 – abcam, LOT ab41970
 - NFL – MyBioSource, LOT 03597
 - A-synuklein – Sigma, LOT 027M4025V
- vzorky plazem pacientů s různými neurodegeneracemi dodané Motolskou nemocnicí

Chemikálie:

- Koutovací vazebný roztok BIC (NaCO_3 pH 9.5, 1,1M) 10x ředěný,
- PBS (Phosphate buffered Saline, LOT 7MB109),
- detergent Tween 20, LOT SLBZ5913
- Promývací roztok PBST (PBS s detergentem Tween)
- BSA (Bovine serum Albumin, Sigma – Aldrich, LOT SLBT 8348),
- Blokovací roztok (1% BSA v PBST),
- Konjugát NOVEX 1 mg Goat Anti-human IgG Fc antibody, HRP conjugate, highly cross-adsorbed, LOT 23-21-101711,
- STOP roztok (1M H_2SO_4),
- H_2O_2 a TMB (3,3',5,5'- tetramethylbenzidine, LOT SG2434022) jako substrát.

Přístroje:

- Pipety eppendorf 10 ul – 5000 ul,
- Třepačka Heidolph titramax 100,
- Promývačka Thermo Wellwash 4MK2,
- Spektrofotometr TECAN spc infinite M200PRO,
- PC

1. Koutování desek

- a) Příprava vazebného roztoku (BIC)

Navážíme 0,320g NaCO₃ a 0.580 g NaHCO₃ a rozpustíme ve 100 ml destilované vody.

Roztok BIC je připraven z roztoku 10x, je tedy potřeba ho 10x naředit v deionizované vodě (ředění: 1 díl BIC:9 dílů dH₂O). Při koutování 100 µl/jamku je na jednu desku potřeba asi 10 ml roztoku. U pracovní koncentrace vazebného roztoku překontrolujeme pH, případně upravíme na pH = 9,6 ± 0,1 pomocí 30% NaOH nebo 1M HCl.

b) Naředění antigenu ve vazebném roztoku

V roztoku BIC naředíme antigen, tak aby koncentrace antigenu v BIC byla 2,5 ug/ml. Nejdříve vysrážíme 250 ul antigenu v methanolu a rozpustíme v 1,5 ml vody (koncentrace antigenu je 0,226 mg/ml v 1,5 ml vody) a takto naředěný antigen v BIC je napipetován v objemu 100 µl na jamku. Takto nakoutované destičky jsou nejprve hodinu ponechány při laboratorní teplotě, a poté přes noc inkubovány v lednici (celkově inkubace 20-24hod).

c) Příprava PBST

Mezitím si připravíme promývací roztok 1000ml 10% PBST, což je roztok PBS s přídatkem detergentu Tween. 100ml PBS rozpustíme v 900ml destilované vody a přidáme 200 ul Tweenu.

d) Příprava 1% BSA v PBST

Pro blokaci desek používáme 1% BSA v PBST, které připravíme tak, že navážíme 0,5 ug BSA, které přesypeme do zkumavky a dolijeme PBST do 50 ml. Toto množství stačí na dvě desky.

e) Zablokování jamek

Do jamek je přidán roztok PBST s BSA (bez odstranění antigenu a bez promytí) tak, aby výsledná koncentrace BSA v jamce byla 1% a celkový objem tekutiny v jamce byl 200 µl (při koutování antigenu v objemu 100 µl/jamku je tedy přidáno 100 µl 2% roztoku BSA v BIC; na 10 ml 2% BSA v BIC tedy navážíme 0,2 g BSA). Desky jsou opět inkubovány přes noc v lednici (celkově inkubace 20-24hod).

f) Vysušení a uchovávání

Po inkubaci jsou jamky promyty nejprve 1x promývacím roztokem PBST, který jsme si připravili, a poté 2x deionizovanou vodou. Následně jsou desky vysušeny v inkubátoru při 37°C 3 hod. (Pokud nejsou desky suché, je možné čas sušení prodloužit). Jestliže nejsou desky hned používány, jsou vakuově zabaleny a uchovávány v lednici.

2. Vlastní provedení ELISA

a) Inkubace primární protilátky

Připravíme si pracovní koncentraci vzorků tak, abychom měli na jeden vzorek trojí koncentraci v tripletu, zvolíme si tedy koncentrace 1:50, 1:150 a 1:450 a spočítáme, kolik potřebujeme materiálu:

Ředění:

1:50 (A): celkem 510 ul, použijeme 12 ul plazmy, které přidáme ke 498 ul 1% BSA v PBST.

1:150 (B): Odebereme 170 ul z (A): a přidáme je ke 340 ul 1% BSA v PBST.

1:450 (C): Odebereme 170 ul z (B): a přidáme je ke 340 ul 1% BSA v PBST.

Do jamek pipetujeme 100 ul zředěného vzorku a necháme 60 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Poté 4x promyjeme 200 µl PBST roztoku.

Pipetujeme do jamek následujícím způsobem:

Tab. 2: 96 jamková mikrotitrační destička se znázorněním napipetovaných koncentrací vzorků

	1	2	3 x	4	5	6 x	7	8	9 x	10	11	12 x
A	1:50			1:150			1:450			1:50		
B										1:150		
C										1:450		
D										1:50	ST	
E										1:150		
F										1:450		
G											blank	
H												

Vzorky: č. 515 (jamky A1-9), č. 534 (B1-9), č. 535 (C1-9), č. 538 (D1-9), č. 571 (E1-9), č. 634 (F1-9), č. 680 (G1-9), č. 714 (H1-9), č. 730 (A10-12, B10-12, C10-12).

- Jako standard (kontrolní vzorek) použijeme plazmu zdravého jedince
- Jako blank použijeme 1% BSA v PBST
- Jamky označené křížkem (3, 6, 9, 12) nejsou potaženy antigenem

b) Inkubace sekundární protilátky

Jako sekundární protilátku používáme anti-human HRP 1:2 s glycerolem, je tedy třeba spočítat, kolik jí budeme potřebovat. Koncentrace bude 1: 15 000 v 1% BSA v PBST a do každé jamky přidáváme 100 ul sekundární protilátky. Budeme tedy pipetovat 4 ul protilátky na 30 ml 1% BSA v PBST. Přikryjeme a necháme inkubovat 30 minut v laboratorní teplotě a poté 4x promyjeme 200 ul PBST.

c) Přidání substrátu

Po promytí a řádném vyklepnutí veškeré tekutiny z jamek, je do každé jamky přidáno 100 µl roztoku TMB a H₂O₂. Po napipetování 1. jamky jsou zapnuty stopky na 15 min, aby v každé jamce byl roztok přesně stejnou dobu. Desku přikryjeme tak, aby k ní nepronikalo světlo, a inkubujeme při laboratorní teplotě na třepače.

d) Zastavení reakce

Reakci zastavíme přesně po uplynutí 15 min přidáním 100 µl STOP roztoku do každé jamky bez promytí. Snažíme se dodržovat stejnou rychlost a pořadí jako při pipetování TMB, aby v každé jamce probíhala reakce stejně dlouho.

2. Vyhodnocení testu

Výsledné hodnoty absorbance odečteme při vlnové délce 450 nm a odečteme interferující hodnotu OD (optická densita) při vlnové délce 620-690 nm (referenční filtr) na spektrofotometru.

12.1 **Výsledky**

Výsledky experimentů jsou graficky znázorněny v grafech v příloze (kapitola 15 Přílohy) a jsou relativně vztaženy ke zdravému jedinci, tedy je to relativní poměr hladin

autoprotilátek pacientů s neurodegenerací ku hladinám autoprotilátek nalezených u zdravých jedinců. Zvýšené hodnoty ukazují na zvýšené protilátky u pacientů s neurodegeneracemi. To znamená, že čím vyšší číslo oproti jedné, tím vyšší je hladina autoprotilátek u pacientů, a naopak, číslo menší než jedna vyjadřuje sníženou hladinu autoprotilátek u pacientů, hladiny autoprotilátek jsou stejné, pokud hodnoty odpovídají jedné. Grafy jsou vlastní práce vytvořené v programu GraphPad.

Kalibrační křivka je uvedena pouze u proteinu tau 441, jiné autoprotilátky potřebné ke kalibraci nebyly k dispozici. Ke kalibraci byly použity vyizolované protilátky z IVIG.

13 ZÁVĚR

Z výše uvedených grafů je patrné, že v plazmě pacientů s různými neurodegeneracemi byly detekovány protilátky proti vybraným antigenům (nejdelší forma proteinu tau, GFAP, S100b, TDP43, Nfl, α - synuklein. Dosud byly analyzovány vzorky s AN, MKP a VD, pouze pár vzorků ostatních nemocí. Zde můžeme vyzdvihnout, že se nám povedlo detekovat protilátky pro TDP43, které v plazmě ještě nebyly popsány.

U prvního grafu můžeme dobře vidět, že u vzorků AN pacientů je poměr OD a průměru výsledků naměřených hladin protilátek proti nejdelší formě tau proteinu vyšší než jedna, což odpovídá vyšší hladině autoprotiilátek oproti zdravému jedinci. Také jsou u AN zvýšené hodnoty autoprotiilátek proti antigenům GFAP, TDP - 43 a α - synukleinu, výrazně zvýšené jsou hladiny autoprotiilátek proti S100b a Nfl.

Naproti tomu je u MKP vzorků vidět, že poměr OD a průměru výsledků naměřených hladin protilátek proti nejdelší formě tau proteinu je roven jedné, což znamená stejnou hladinu autoprotiilátek jako u kontrolních vzorků.

U vzorků pozitivních na vaskulární demenci vidíme, že rozptyl výsledků je poměrně velký a hodnoty se liší. Autoprotiilátky proti nejdelší formě tau jsou zvýšené, autoprotiilátky proti α -synukleinu jsou snižené, ostatní hladiny jsou stejné jako u zdravého pacienta.

Cílem hledání autoprotiilátek proti antigenům u neurodegenerativních onemocnění je snaha nalézt určitý panel protilátek, který by nám pomohl v diferenciální diagnostice. Z výše uvedených výsledků je patrné, že je zapotřebí zanalyzovat větší množství vzorků, abychom mohli říci, které protilátky zvolit jako biomarkery.

Tato práce popisuje experimenty, které jsou součástí projektu společnosti Vidia spol. s.r.o, jejímž cílem je vytvořit diagnostický kit pro rychlejší a jednodušší diagnostiku neurodegenerativních onemocnění. Uvedené výsledky jsou pouze předběžné, protože experimenty stále probíhají. V blízké době laboratoř plánuje kompletaci nasbíraných vzorků a následnou analýzu všech pacientů pro možné vyvození závěrů a statistické vyhodnocení nalezených hladin autoprotiilátek s cílem nalézt vzorec protilátek s dostatečně vysokou specificitou a senzitivitou.

14 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALVES, G., LANGE, J., BLENNOW, K., et al. CSF A β 42 predicts early-onset dementia in Parkinson disease. *Neurology* [online]. 2014, **80** (20), 1784–1790 [cit. 2020-05-31]. ISSN 1526-632X. Dostupné z : <https://n.neurology.org/content/82/20/1784>

ANDERSON, N. D. State of the science on mild cognitive impairment (MCI). *CNS Spectr.* [online]. 2019, **24** (1), 78–87 [cit. 2020-06-15]. ISSN 1092-8529. Dostupné z: <https://www.cambridge.org/core/journals/cns-spectrums/article/state-of-the-science-on-mild-cognitive-impairment-mci/9E28EC622A1911D82E18E4023811D79D>

ANDERSSON, C., BLENNOW, K., ALMKVIST, O., et al. Increasing CSF phospho-tau levels during cognitive decline and progression to dementia. *Neurobiology of Aging* [online]. 2008, **29** (10), 1466–1473 [cit. 2020-05-11]. ISSN 01974580. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197458007001388>

ASHRAF, A., Z. FAN, D. J. BROOKS et al. Cortical hypermetabolism in MCI subjects: a compensatory mechanism? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* [online]. 2015, **42** (3), 447–458 [cit. 2020-07-13]. ISSN 1619-7089. Dostupné z: doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25267349/>

AUGUSTINACK, J. C., VAN DER KOUWE A. J. W. Chapter 69 - Postmortem imaging and neuropathologic correlations. *Handbook of Clinical Neurology* [online]. **13** (136), 1321-1339 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444534866000697#!>.

AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* [online]. 2015, **72**, 4–15 [cit. 2020-04-07]. ISSN 01969781. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019697811500131X>

BARTOS, A., FIALOVÁ, L., ŠVARCOVÁ, J., et al. Patients with Alzheimer disease have elevated intrathecal synthesis of antibodies against tau protein and heavy neurofilament. *Journal of Neuroimmunology* [online]. 2012, **252** (1), 100–105 [cit. 2020-

05-26]. ISSN 0165-5728, 1872-8421, Dostupné z: [https://www.jni-journal.com/article/S0165-5728\(12\)00245-7/abstract](https://www.jni-journal.com/article/S0165-5728(12)00245-7/abstract)

BARTOS, A., GREGUS, D., IBRAHIM, I., et al. Brain volumes and their ratios in Alzheimer's disease on magnetic resonance imaging segmented using Freesurfer 6.0. *Psychiatry Research: Neuroimaging* [online]. 2019, **287**, 70–74 [cit. 2020-07-14]. ISSN 0925-4927. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925492718302324>

BARTOS, A., FIALOVÁ, L., ŠVARCOVÁ. Lower Serum Antibodies Against Tau Protein and Heavy Neurofilament in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* [online]. 2018, **64** (3), 751–760 [cit. 2020-07-14]. ISSN 0925-4927. Dostupné z: <https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad180039>

BERANOVÁ, M., TONAR, Z. Principy a příklady imunohistochemie. *Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni* [online]. 2012, 32 [cit. 2020-07-05]. Dostupné z: http://histologie.lfp.cuni.cz/education/guides/ihc_hi_res.pdf.

BERMAN, S. B., MILLER - PATTERSON, C. Chapter 2 - PD and DLB: Brain imaging in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, in: Becker, J. T., Cohen, A.D. (Eds.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science, Brain Imaging. Academic Press* [online]. 2019, **165**, 167–185 [cit. 2020-06-04]. ISBN 978-0-12-818361-8. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877117319301152>

BIESSELS, G. J. Diagnosis and treatment of vascular damage in dementia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2016, **1862** (5), 869–877. [cit. 2020-06-10]. ISSN 0925-4439. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443915003488>

BLENNOW, K., MATTSSON, N., SCHÖLL, et al. Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. 2015, **36** (5), 297–309. [cit. 2020-05-10]. ISSN 01656147. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614715000425>

BOGGS, J. M. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell. Mol. Life Sci.* [online]. 2016, **63** (17), 1945–1961 [cit. 2020-05-31]. ISSN 1420-9071. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-006-6094-7>

BRAAK, H., DEL TREDICI, K., BRATZKE, H., et al. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J. Neurol.* [online]. 2002, **249** (3), iii1 – iii5 [cit. 2020-05-20]. ISSN 1432-1459. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00415-002-1301-4>

CHANDOGA, J., JUNGOVÁ, P., KOLEJÁKOVÁ, K., et al. Molekulárno-genetické a biochemické aspekty neurogenetických ochorení (Ochorenia podmienené molekulárno - genetickými patológiami štrukturálnych konštituentov nervového systému - časť 1). *Neurologie pro praxi* [online]. 2013, **14** (4), 169–174 [cit. 2020-05-08]. ISSN 12131814, 18035280. Dostupné z: <http://solen.cz/doi/10.nnnn/neu.2013.059.html>

CHEN, C., DING, X., AKRAM, N., et al. Fused in Sarcoma: Properties, Self-Assembly and Correlation with Neurodegenerative Diseases. *Molecules* [online]. 2019, **24** (8), 1622 [cit. 2020-05-30]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6514960/>

CHIU, M.- J., CHEN, Y.-F., CHEN, T.-F., et al. Plasma tau as a window to the brain-negative associations with brain volume and memory function in mild cognitive impairment and early alzheimer's disease. *Human Brain Mapping* [online]. 2014, **35** (7), 3132–3142 [cit. 2020-05-11]. ISSN 1097-0193. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hbm.22390>

DAVIE, C. A. A review of Parkinson's disease. *British Medical Bulletin* [online]. 2008, **86** (1), 109–127 [cit. 2020-05-18]. ISSN 0007-1420, 1471-8391. Dostupné z: <https://academic.oup.com/bmb/article-lookup/doi/10.1093/bmb/ldn013>

DE SOUZA, L. C., CHUPIN, M., LAMARI, F., et al. CSF tau markers are correlated with hippocampal volume in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* [online]. 2012,

33 (7), 1253–1257. [cit. 2020-05-26]. ISSN 0197-4580. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019745801100056X>

DE VIRGILIO, A., GRECO, A., FABBRINI, G., et al. Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation. *Autoimmunity Reviews* [online]. 2016, **15** (10), 1005–1011 [cit. 2020-05-28]. ISSN 1873-0183. Dostupné z:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27497913/>

DE VOS, A., JACOBS, D., STRUYFS, H., et al. C-terminal neurogranin is increased in cerebrospinal fluid but unchanged in plasma in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* [online]. 2015, **11** (12), 1461–1469 [cit. 2020-05-26]. ISSN 1552-5260. Dostupné z: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.jalz.2015.05.012>

DEVENNEY, E. M., AHMED, R. M., HODGES, J. R. Frontotemporal dementia, *Elsevier* [online]. 2019, **167**, 279–299 [cit. 2020-06-15]. ISBN 978-0-12-804766-8. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128047668000157>

DHIMAN, K., BLENNOW, K., ZETTERBERG, H., et al. Cerebrospinal fluid biomarkers for understanding multiple aspects of Alzheimer's disease pathogenesis. *Cellular and molecular life science* [online]. 2019, **76** (10), 1833–1863 [cit. 2020-05-31]. ISSN 1420-9071. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-019-03040-5>

DUBOIS, B., FELDMAN, H. H., JACOVA, C., et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS – ADRDA criteria. *The Lancet Neurology* [online]. 2007, **6** (8), 734–746 [cit. 2020-05-10]. ISSN 14744422. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442207701783>

DUBOIS, B., FELDMAN, H. H., JACOVA, C., et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* [online]. 2010, **9** (11), 1118–1127. [cit. 2020-04-29]. ISSN 1474-4422. Dostupné z [https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422\(10\)70223-4/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422(10)70223-4/fulltext)

GAO, J., WANG, L., HUNTLEY, M. L., et al. Pathomechanisms of TDP-43 in neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry* [online]. 2018, **146** (1), 7–20 [cit. 2020-05-28]. ISSN 1471-4159. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jnc.14327>

GAO, L., TANG, H., NIE, K., et al. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein as a biomarker for Parkinson's disease diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Neurosci.* [online]. 2015, **125** (9), 645–654 [cit. 2020-05-30]. ISSN 1563-5279. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00207454.2014.961454?journalCode=ines20>

GILKS, W. P., ABOU-SLEIMAN, P.M., GANDHI, S., et al. A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *The Lancet* [online]. 2005, **365** (9457), 415–416 [cit. 2020-05-21]. ISSN 0140-6736, 1474-547X. Dostupné z: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(05\)17830-1/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(05)17830-1/abstract)

GOMPERTS, S. N. Lewy Body Dementias: Dementia With Lewy Bodies and Parkinson Disease Dementia. *Continuum (Minneapolis)* [online]. 2016, **22** (2), 435–463 [cit. 2020-06-07]. ISSN 1538-6899. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27042903/>

GOOSSENS, J., VANMECHELEN, E., TROJANOWSKI, J. Q., et al. TDP-43 as a possible biomarker for frontotemporal lobar degeneration: a systematic review of existing antibodies. *Acta Neuropathol. Commun.* [online]. 2015, **3**, 15 [cit. 2020-05-30]. ISSN 2051-5960. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4380254/>

GORELICK, P. B., COUNTS, S. E., NYENHUIS, D. Vascular cognitive impairment and dementia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2016, **1862** (5), 860–868 [cit. 2020-06-10]. ISSN 0925-4439. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443915003695>

GREER, J. M., LEES, M. B. Myelin proteolipid protein--the first 50 years. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2002, **34** (3), 211–215

[cit. 2020-05-31]. ISSN 1357-2725. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1357272501001364>

GROBLEWSKA, M., MUSZYŃSKI, P., WOJTULEWSKA-SUPRON, A., et al. The Role of Visinin-Like Protein-1 in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* [online]. 2015, **47** (1), 17–32 [cit. 2020-06-05]. ISSN 1875-8908. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26402751/>

HANSSON, O., HALL, S., ÖHRFELT, A., et al. Levels of cerebrospinal fluid α -synuclein oligomers are increased in Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies compared to Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* [online]. 2014, **6** (3), 25 [cit. 2020-05-30]. ISSN 1758-9193. Dostupné z: <https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/alzrt255>

HARDIMAN, O., AL-CHALABI, A., CHIO, A., et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. 2017, **3** (1), 17071 [cit. 2020-06-10]. ISSN 2056-676X. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrdp201771>

HEAD, E., POWELL, D., GOLD, B. T., et al. Alzheimer's Disease in Down Syndrome. *Eur. J. Neurodegener. Dis.* [online]. 2012, **1** (3), 353–364 [cit. 2020-05-03]. ISSN 2279-5855. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4184282/>

HOLECEK, V., ROKYTA, R. Possible etiology and treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuro Endocrinology Letters* [online]. 2018, **38** (3), 528–531 [cit. 2020-06-15]. ISSN 0172-780X. Dostupné z: <http://www.nel.edu/possible-etiology-and-treatment-of-amyotrophic-lateral-sclerosis-2569/>

HROMADKOVA, L., KOLAROVA, M., JANKOVICOVA, B., et al. Identification and characterization of natural antibodies against tau protein in an intravenous immunoglobulin product. *Journal of Neuroimmunology* [online]. 2015, **289**, 121–129 [cit. 2020-07-07]. ISSN 01655728. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572815300631>

HU, X., YANG, Y., GONG, D. A meta - analysis of cerebrospinal fluid visinin-like protein-1 in alzheimer's disease patients relative to healthy controls and mild cognitive impairment patients. *Neurosciences* [online]. 2017, **22** (2), 94–101 [cit. 2020-05-05]. ISSN 1319-6138. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5726829/>

IADECOLA, C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* [online]. 2013, **80** (4), nestránkováno [cit. 2020-06-08]. ISSN 0896-6273. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3842016/>

JANELIDZE, S., HERTZE, J., ZETTERBERG, H., et al. Cerebrospinal fluid neurogranin and YKL-40 as biomarkers of Alzheimer's disease. *Annals of Clinical and Translational Neurology* [online]. 2016, **3** (1), 12–20 [cit. 2020-05-27]. ISSN 2328-9503. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/acn3.266>

JANKOVIC, J., AGUILAR, L. G. Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* [online]. 2008, **4** (4), 743–757 [cit. 2020-06-08]. ISSN 1176-6328. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2536542/>

JAY, T. R., VON SAUCKEN, V. E., LANDRETH, G. E. TREM2 in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurodegeneration* [online]. 2017, **12** (1), 56 [cit. 2020-06-05]. ISSN 1750-1326. Dostupné z: <https://moleculareneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13024-017-0197-5>

JELLINGER, K. A. Dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease-dementia: current concepts and controversies. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria)* [online]. 2018, **125** (4), 615–650 [cit. 2020-06-07]. ISSN 1435-1463. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00702-017-1821-9>

JENDROSKA, K., KASHIWAGI, M., SASSOON, J., et al. Amyloid β -peptide and its relationship with dementia in Lewy body. *Journal of Neural Transmission. Supplementa. Springer* [online]. 1997, **51**, 137–144 [cit. 2020-05-31]. ISBN 978-3-7091-6846-2. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-6846-2_11

JIRÁK, R., KOUKOLÍK, F. Alzheimerova nemoc a další demence. 1998, Praha: Grada, ISBN 80-7169-615-3

KALARIA, R. N. The pathology and pathophysiology of vascular dementia. *Neuropharmacology* [online]. 2018, **134**, 226–239 [cit. 2020-06-08]. ISSN 0028-3908. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390817306275>

KOEHLER, N. K. U., STRANSKY, E., SHING, M., et al. Altered serum IgG levels to α -synuclein in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *PloS One* [online]. **8** (5), e64649 [cit. 2020-05-30]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article/figure?id=10.1371/journal.pone.0064649.g001>

KOSIK, K. S., 1993. The Molecular and Cellular Biology of Tau. *Brain Pathology* [online]. 1993, 3 (1), 39–43 [cit. 2020-05-27]. ISSN 1750-3639. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1750-3639.1993.tb00724.x>

KVARTSBERG, H., DUIJS, F. H., INGELSSON, M., et al. Cerebrospinal fluid levels of the synaptic protein neurogranin correlates with cognitive decline in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* [online]. 2015, **11** (10), 1180–1190 [cit. 2020-05-26]. ISSN 1552-5260. Dostupné z: <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.jalz.2014.10.009>

LASHLEY, T., SCHOTT, J. M., WESTON, P., et al. Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects. *Disease Models & Mechanisms* [online]. 2018, **11** (5). Nestránkováno [cit. 2020-05-31]. ISSN 1754-8411. Dostupné z: <https://dmm.biologists.org/content/11/5/dmm031781>

LENGLET, T., CAMDESSANCHÉ, J. - P. Amyotrophic lateral sclerosis or not: Keys for the diagnosis. *Revue Neurologique* [online]. 2017, **173** (5), 280–287 [cit. 2020-06-15]. ISSN 00353787. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003537871730471X>

LIN, A. V. Indirect ELISA, *Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY [online]. 2015, **1318**, 51–59 [cit. 2020-07-02]. ISBN 978-1-4939-2741-8. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2742-5_5

LÖVHEIM, H., ELGH, F., JOHANSSON, A., et al. Plasma concentrations of free amyloid- β cannot predict the development of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* [online]. 2017, **13** (7), 778-772 [cit. 2020-05-10]. ISSN 15525260. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1552526016331259?via%3Dihub>

MAFTEI, M., THURM, F., SCHNACK, C., et al. Increased Levels of Antigen-Bound β -Amyloid Autoantibodies in Serum and Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients. *PLoS ONE* 8 [online]. 2013, **8**(7): e68996 [cit. 2020-05-26]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3715516/>

MAJUMDER, V., GREGORY, J. M., BARRIA, M. A., et al. TDP-43 as a potential biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurology* [online]. 2018, **18** (1), 90 [cit. 2020-06-15]. ISSN 1471-2377. Dostupné z: <https://bmneuro.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12883-018-1091-7>

MECOCCI, P., PARNETTI, L., ROMANO, G., et al. Serum anti-GFAP and anti-S100 autoantibodies in brain aging, Alzheimer's disease and vascular dementia. *Journal of Neuroimmunology* [online]. 1995, **57** (1), 165–17090 [cit. 2020-05-26]. ISSN 0165-5728, 1872-8421. Dostupné z: [https://www.jni-journal.com/article/0165-5728\(94\)00180-V/abstract](https://www.jni-journal.com/article/0165-5728(94)00180-V/abstract)

O'BRIEN, J. T., THOMAS, A. Vascular dementia. *Lancet* [online]. 2015, **386**, 1698–1706 [cit. 2020-06-08]. ISSN 1474-547X. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/284013385_Vascular_Dementia

OLNEY, N. T., SPINA, S., MILLER, B. L. Frontotemporal Dementia. *Neurologic Clinics* [online]. 2017, **35** (2), 339–374 [cit. 2020-06-15]. ISSN 07338619. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733861917300087>

OLSSON, B., LAUTNER, R., ANDREASSON, U., et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*

Neurology [online]. 2016, **15** (7), 673–684 [cit. 2020-05-10]. ISSN 14744422. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442216000703>

OSKARSSON, B., GENDRON, T. F., STAFF, N. P. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. *Mayo Clinic Proceedings* [online]. 2018, **93** (11), 1617–1628 [cit. 2020-06-11]. ISSN 1942-5546. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30401437/>

PALERMO, G., CERAVOLO, R., BONUCCELLI, U. Advances in the pharmacotherapeutic management of dementia with Lewy bodies. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* [online]. 2018, **19** (15), 1643–1653 [cit. 2020-06-08]. ISSN 1465-6566, 1744-7666. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14656566.2018.1519548>

PAPUĆ, E., KURZEPA, J., KURYS-DENIS, E., et al. Humoral response against glial derived antigens in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* [online]. 2014, **566**, 77–81 [cit. 2020-06-30]. ISSN 1872-7972. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304394014001475>

PASCUAL, G., WADIA, J. S., ZHU, X., et al. Immunological memory to hyperphosphorylated tau in asymptomatic individuals. *Acta Neuropathologica* [online]. 2017, **133**, 767–783 [cit. 2020-05-26]. ISSN 1432-0533. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00401-017-1705-y>

PEDERSEN, J. T., SIGURDSSON, E.M. Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2015, **21** (6), 394–402 [cit. 2020-05-11]. ISSN 1471-4914, 1471-499X. Dostupné z: [https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/abstract/S1471-4914\(15\)00058-1](https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/abstract/S1471-4914(15)00058-1)

QUARLES, R. H. Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J. Neurochem.* [online]. 2007, **100** (6), 1431–1448 [cit. 2020-05-30]. ISSN 0022-3042. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-4159.2006.04319.x>

REKTOROVÁ, I. 2006. Frontotemporální lobární degenerace – diagnóza z neuropsychiatrického pomezí. *Neurologie pro praxi* [online]. 2006, **7** (4), 199-202 [cit.

2020-05-28]. ISSN 1213-1814. Dostupné z:
https://www.neurologiepropraxi.cz/artkey/neu-200604-0007_frontotemporalni_lobarni_degenerace_-_diagnoza_z_neuro-psychiatrickeho_pomezi.php

ROBERTS, R., KNOPMAN, D. S. Classification and Epidemiology of MCI. *Clinics in Geriatric Medicine* [online]. 2013, **29** (4), 753–772 [cit. 2020-05-28]. ISSN 07490690. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749069013000608>

ROSENTHAL, Z. P., KRAFT, A. W., CZERNIEWSKI, L., et al. Targeting Astrocytes With Viral Gene Therapy for Alzheimer's Disease, in book: Gene Therapy in Neurological Disorders. *Academic Press Elsevier Amsterdam* [online]. 2018, 97–138 [cit. 2020-04-29]. ISBN 978-0-12-809813-4. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128098134000053>

ULMANOVÁ, O., RŮŽIČKA, E. Parkinsonova nemoc - základy terapie a diferenciální diagnostiky - základy terapie a diferenciální diagnostiky. *Psychiatrie pro Praxi* [online]. 2007, **2**, 60-62 [cit. 2020-05-20]. ISSN 12130508, 18035272. Dostupné z:
<http://solen.cz/doi/10.nnnn/psy.2007.015.html>

RŮŽIČKA, E., 2006. Parkinsonova nemoc. *Čes Slov Neurol Neurochir* [online]. 2006, **4**, 241–258 [cit. 2020-05-20]. ISSN nedostupné. Dostupné z:
https://www.researchgate.net/publication/47070867_Parkinsonova_nemoc

SALAMEH, J. S., BROWN, R. H., BERRY, J.D. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Review. *Seminars in Neurology* [online]. 2015, **35** (4), 469–476 [cit. 2020-06-14]. ISSN 0271-8235, 1098-9021. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0035-1558984>

SANFILIPPO, C., CASTROGIOVANNI, P., IMBESI, R., et al. Sex difference in CHI3L1 expression levels in human brain aging and in Alzheimer's disease. *Brain Research* [online]. 2019, **1720**, 146305 [cit. 2020-06-06]. ISSN 00068993. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899319303518>

SCHADE, S., MOLLENHAUER, B. Biomarkers in biological fluids for dementia with Lewy bodies. *Alzheimers Res. Ther.* [online]. 2014, **6** (5), 72 [cit. 2020-06-07]. ISSN 1758-9193. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4255553/>

SEZGIN, M., BILGIC, B., TINAZ, S., et al. Parkinson's Disease Dementia and Lewy Body Disease. *Semin. Neurol.* [online]. 2019, **39** (2), 274–282 [cit. 2020-06-07]. ISSN 1098-9021. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/332098020_Parkinson's_Disease_Dementia_and_Lewy_Body_Disease

SIMRÉN, J., ASHTON, N. J., BLENNOW, K., et al. An update on fluid biomarkers for neurodegenerative diseases: recent success and challenges ahead. *Current Opinion in Neurobiology* [online]. 2020, **61**, 29–39 [cit. 2020-06-17]. ISSN 09594388. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438819301308>

SIVASATHIASEELAN, H., MARSHALL, C., AGUSTUS, J., et al. Frontotemporal Dementia: A Clinical Review. *Seminars in Neurology* [online]. 2019, **39** (2), 251–263 [cit. 2020-06-17]. ISSN 0271-8235, 1098-9021. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0039-1683379>

SMITH, L. M., SCHIESS, M. C., COFFEY, M. P., et al. α -Synuclein and anti- α -synuclein antibodies in Parkinson's disease, atypical Parkinson syndromes, REM sleep behavior disorder, and healthy controls. *PloS One* [online]. 2012, **7** (12), e52285 [cit. 2020-05-30]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0052285>

STEFANIS, L., 2012. α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2012, **2** (2), a009399 [cit. 2020-05-30]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3281589/>

STEINER, J., BOGERTS, B., SCHROETER, M. L., et al. S100B protein in neurodegenerative disorders. *Clin. Chem. Lab. Med.* [online]. 2011, **49** (3), 409–424 [cit. 2020-05-26]. ISSN 1437-4331. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21303299/>

STRIMBU, K., TAVEL, J. A. What are Biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS* [online]. 2010, **5** (6), 463–466 [cit. 2020-05-24]. ISSN 1746-630X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3078627/>

STRÖHLE, A., SCHMIDT, D. K., SCHULTZ, F., et al. Drug and Exercise Treatment of Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-Analysis of Effects on Cognition in Randomized Controlled Trials. *The American Journal of Geriatric Psychiatry* [online]. 2015, **23** (12), 1234–1249 [cit. 2020-06-16]. ISSN 10647481. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1064748115002134>

SUN, M. - K. Potential Therapeutics for Vascular Cognitive Impairment and Dementia. *Current Neuropharmacology* [online]. 2018, **16** (7), 1036–1044 [cit. 2020-06-10]. ISSN 1875-6190. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29046153/>

THELIN, E. P., NELSON, D. W., BELLANDER, B. - M. A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury. *Acta Neurochirurgica* [online]. 2017, **159** (2), 209–225 [cit. 2020-05-26]. ISSN 0001-6268. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5241347/>

VOKURKA, M., HUGO, J. Velký lékařský slovník. 2010. Praha: Maxdorf, 1190 s. Jessenius. ISBN 978-80-7345-456-2.

VYHNÁLEK, M., LACZÓ, J., SHEARDOVÁ, K., et al. Časná diagnostika Alzheimerovy nemoci ve světle nových diagnostických kritérií. *Neurologie pro praxi* [online]. 2012, **13** (6), 325-329 [cit. 2020-05-03]. ISSN 12131814, 18035280. Dostupné z: https://www.solen.cz/artkey/neu-201206-0009_Casna_diagnostika_Alzheimerovy_nemoci_ve_svetle_novych_diagnostickykh_kriterii.php

WU, J., LI, L. Autoantibodies in Alzheimer's disease: potential biomarkers, pathogenic roles, and therapeutic implications. *Journal of Biomedical Research* [online]. 2016, **30** (5), 361–372 [cit. 2020-05-25]. ISSN 1674-8301. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5044708/>

YAO, Y., TSIRKA, S. E. Mouse monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) functions as a monomer. Int. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2014, **55**, 51–59 [cit. 2020-06-06]. ISSN 1878-5875. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1357272514002532>

YEH, F. L., HANSEN, D. V., SHENG, M. TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2017, **23** (6), 512–533. 59 [cit. 2020-06-05]. ISSN 1471-4914, 1471-499X. Dostupné z: [https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/abstract/S1471-4914\(17\)30047-3](https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/abstract/S1471-4914(17)30047-3)

YEO, I. J., LEE, C.-K., HAN, S.-B., YUN, J., HONG, J.T. Roles of chitinase 3-like 1 in the development of cancer, neurodegenerative diseases, and inflammatory diseases. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2019, **203**, 107394. [cit. 2020-06-06]. ISSN 0163-7258. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725819301378>

ZETTERBERG, H. Applying fluid biomarkers to Alzheimer's disease. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* [online]. 2017, **313** (1), C3 – C10 [cit. 2020-06-06]. ISSN 1522-1563. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28424166/>

ZETTERBERG, H., BLENNOW, K., HANSE, E. Amyloid β and APP as biomarkers for Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, Special Issue: Biomarkers of Alzheimers Disease and Dementia in Cerebrospinal Fluid and Blood [online]. 2010, **45** (1), 23–29 [cit. 2020-06-06]. ISSN 1873-6815. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0531556509001594?via%3Dihub>

ZETTERBERG, H., WILSON, D., ANDREASSON, U., et al. Plasma tau levels in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy* [online]. 2013, **5** (2), 9 [cit. 2020-05-30]. ISSN 1758-9193. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3707015/>

ZHANG, H., NG, K. P., THERRIAULT, J., et al. Cerebrospinal fluid phosphorylated tau, visinin-like protein-1, and chitinase-3-like protein 1 in mild cognitive impairment and

Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration* [online]. 2018, 7, 23. [cit. 2020-06-01]. ISSN 2047-9158. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30311914/>

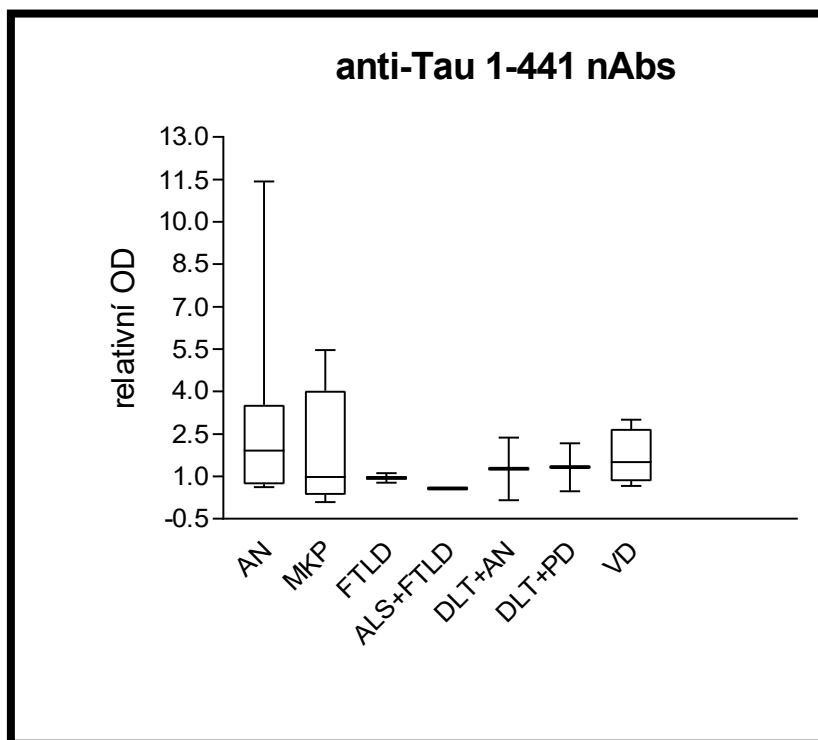
URL 1: Co je demence. *Česká alzheimerovská společnost, o.p.s.* [online]. Copyright © 2015 [cit. 2020-04-29]. Dostupné z: <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/co-je-demence/>

URL 2: Amyloidóza. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2020-06-10]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Amyloid%C3%B3za>

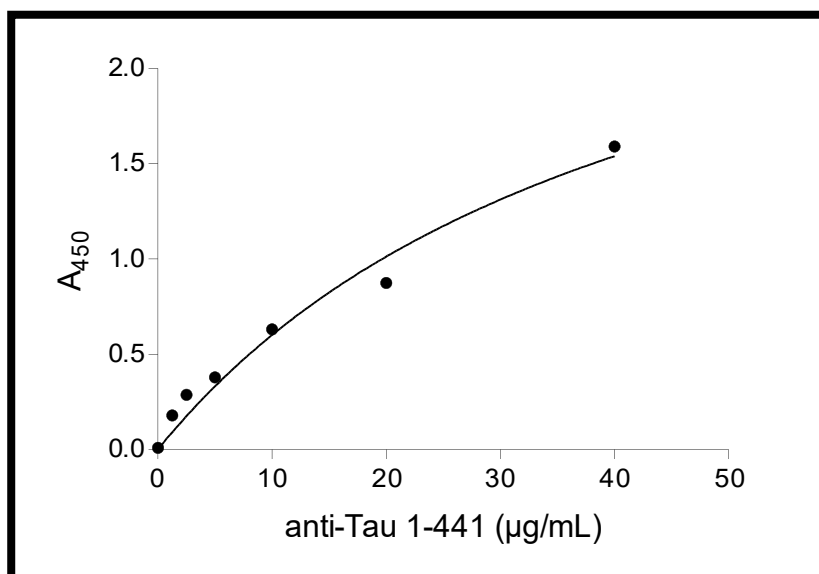
15 PŘÍLOHY

Příloha A Graf č. 1: Výsledky hladin autoprotilátek proti nejdelší formě tau proteinu u neurodegenerativních onemocnění.....	81
Příloha B Graf č. 2: Kalibrační křivka pro kvantifikaci autoprotilátek proti nejdelší formě tau proteinu.....	82
Příloha C Graf č. 3: Výsledky hladin autoprotilátek proti GFAP u neurodegenerativních onemocnění.....	82
Příloha D Graf č. 4: Výsledky hladin autoprotilátek proti S100b u neurodegenerativních onemocnění.....	83
Graf č. 5: Výsledky hladin autoprotilátek proti TDP-43 u neurodegenerativních onemocnění.....	83
Příloha E Graf č. 6: Výsledky hladin autoprotilátek proti NfI u neurodegenerativních onemocnění.....	84
Příloha F Graf č. 7: Výsledky hladin autoprotilátek proti α -synukleinu u neurodegenerativních onemocnění.....	84

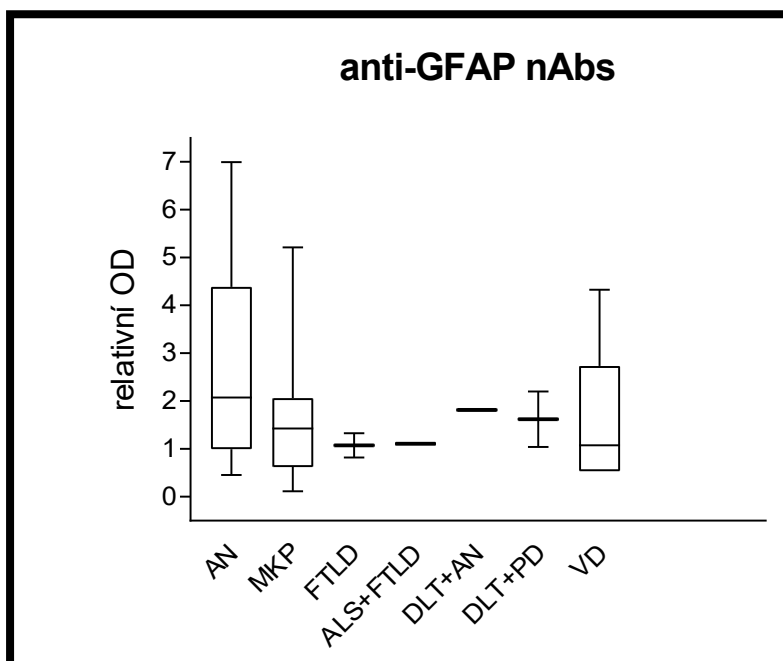
Příloha A Graf č. 1 - Výsledky hladin autoprotilátek proti nejdelší formě tau proteinu u neurodegenerativních onemocnění



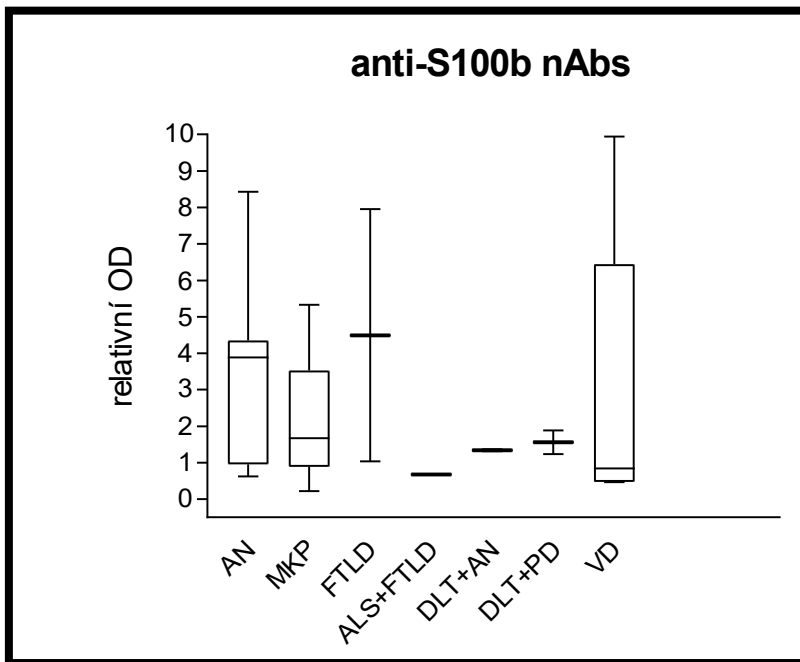
Příloha B Graf č. 2 - Kalibrační křivka pro kvantifikaci autoprotilátek proti nejdelší formě tau proteinu.



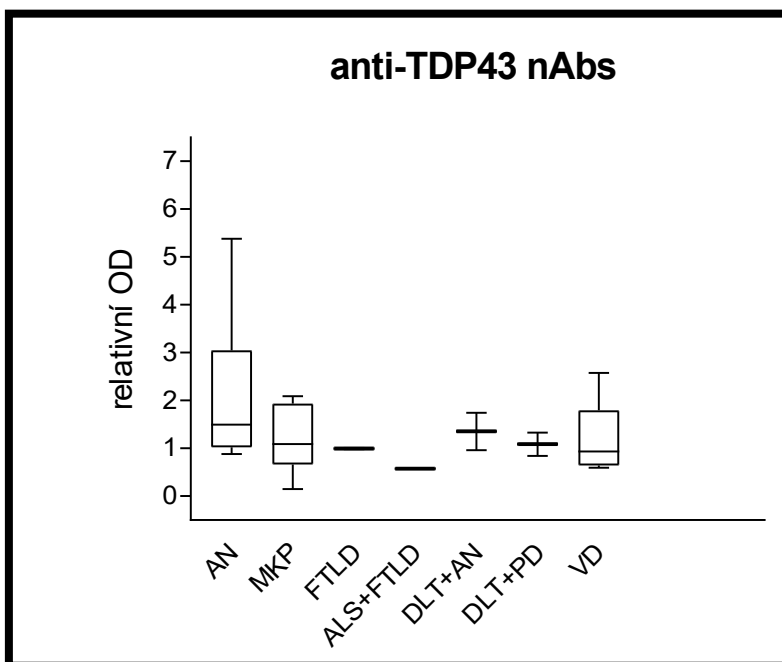
Příloha C Graf č. 3 - Výsledky hladin autoprotilátek proti GFAP u neurodegenerativních onemocnění



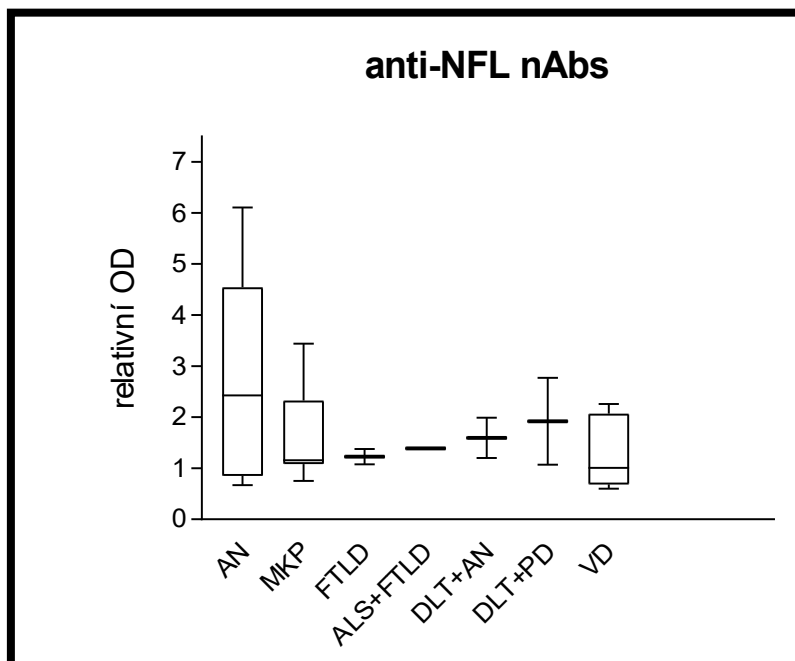
Příloha D Graf č. 4 - *Výsledky hladin autoprotilátek proti S100b u neurodegenerativních onemocnění.*



Příloha E Graf č. 5 - *Výsledky hladin autoprotilátek proti TDP-43 u neurodegenerativních onemocnění*



Příloha F Graf č. 6 - *Výsledky hladin autoprotilátek proti Nfl u neurodegenerativních onemocnění*



Příloha G Graf č. 7 - *Výsledky hladin autoprotilátek proti α -synukleinu u neurodegenerativních onemocnění*

