

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Autoimunitní biomarkery neurodegenerativních onemocnění

Bc. Zuzana Smékalová

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2022

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Autoimmune biomarkers of neurodegenerative diseases

Zuzana Smékalová, BsC.

MASTERS THESIS

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Zuzana Smékalová**
Osobní číslo: **C20460**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Autoimunitní biomarkery neurodegenerativních chorob**
Téma práce anglicky: **Autoimmune Biomarkers Of Neurodegenerative Diseases**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Diplomová práce bude obsahovat tyto základní části: Uvedení do problematiky, literární rešerži, základní cíle práce, popis použité metodiky, experimentální část, diskuzi výsledků a seznam použité literatury.

Práce bude založena na testování přítomnosti a kvantifikaci autoprotilátek v tělních tekutinách osob s diagnostikovanými vybranými neurodegenerativními chorobami (Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc, fontotemporální lobární degenerace, vaskulární demence a případně některé další, jako demence s Lewyho tělísky, amyotropní laterální skleróza; roztroušená skleróza, Huntingtonova nemoc. Rozsah použitých diagnóz bude závislý na dostupnosti diagnostikovaných sér ze spolupracujícího pracoviště (Neurologická klinika 2.LF UK a FN Motol).

Diplomová práce bude navazovat na bakalářskou práci, s postupy, se kterými se studentka v laboratoři Národního ústavu duševního zdraví již seznámila.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **RNDr. Jan Říčný, CSc.**
Národní ústav duševního zdraví
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji: Práci s názvem Imunitní biomarkery neurodegenerativních chorob jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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

V Pardubicích dne 6. 5. 2022

Bc. Zuzana Smékalová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především svému vedoucímu práce RNDr. Janu Říčnému, CSc. za několikaletou spolupráci, sdílení zkušeností, vedení a pomoc při práci v laboratoři i psaní práce a milý přístup. Také děkuji prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, PhD. za trpělivost, ochotu a věcné poznámky při kontrole práce a RNDr. Janu Klaschkovi, Ph.D. z Ústavu informatiky Akademie věd ČR za statistické zpracování výsledků. Děkuji svým rodičům a dětem za obrovskou trpělivost a podporu během celého studia.

ANOTACE

Cílem této diplomové práce je zpracování recentních literárních zdrojů na téma Imunologické biomarkery neurodegenerativních onemocnění a také shrnutí výsledků vlastního výzkumu, který by měl, ve spolupráci se společností Vidia spol. s.r.o., Vestec, Česká republika vést k vyvinutí diagnostické metody pro rutinní diagnostiku vybraných neurodegenerativních onemocnění z krve. Experimentální část diplomové práce probíhala v Národním ústavu duševního zdraví v Klecanech, Česká republika pod vedením RNDr. Jana Říchného, CSc.

Séra pacientů s neurodegenerativními nemocemi jsme pomocí metody ELISA testovali na přítomnost autoprotilátek proti vybraným antigenům u následujících neurodegenerativních chorob: Alzheimerovy choroby (AN), frontotemporální lobární degenerace (FTLD), vaskulární demence (VD) a Parkinsonovy demence (PD). Výsledky pokusů jsou uvedeny v experimentální části diplomové práce.

V první části diplomové práce jsou zpracovány informace z recentní literatury, především z mezinárodních zdrojů, týkající se neurodegenerativních autoimunitních onemocnění a jejich diagnostiky ve spojení se studovanými oborem. Dále jsou uvedeny role autoimunitních procesů v průběhu těchto onemocnění, a také nejběžněji sledované biomarkery.

KLÍČOVÁ SLOVA

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

TITLE

Autoimmune biomarkers of neurodegenerative diseases

ANOTATION

This master thesis brings information from the recent literature on the topic of Autoimmune biomarkers of neurodegenerative diseases and also describes the results of our own research, which should 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 in Klecany, Czech republic under the kind leadership of RNDr. Jan Říčný, CSc. and in cooperation with the company Vidia spol. s.r.o. Vestec, Czech republic.

Sera of patient's with neurodegenerative disorders were tested for the presence of autoantibodies against the selected antigens in presented disorders: Alzheimer's disease (AD), frontotemporal lobar degeneration (FTLD), vascular dementia (VD) and Parkinson's dementia (PD). Our results are presented in the experimental part of the thesis.

In the first part of this master's thesis, the recent information, mostly from the international literature, regarding the neurodegenerative diseases and its diagnostics is presented, as same as the role of the autoimmune response and most common biomarkers.

KEY WORDS

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

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	11
SEZNAM PŘÍLOH.....	12
SEZNAM ZKRATEK.....	14
ÚVOD.....	16
1 NEURODEGENERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ.....	18
1.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA.....	18
1.1.1 Patofyziologie Alzheimerovy choroby	18
1.1.2 Diagnostika Alzheimerovy choroby	19
1.1.2.1 Koncentrace amyloidu β ($A\beta$).....	19
1.1.2.2 Koncentrace tau proteinu	20
1.2 PARKINSONOVA DEMENCE.....	21
1.2.1 Patofyziologie Parkinsonovy demence	21
1.3 VASKULÁRNÍ DEMENCE	22
1.3.1 Diagnostika vaskulární demence.....	22
1.4 FRONTOTEMPORÁLNÍ LOBÁRNÍ DEGENERACE.....	23
1.4.1 Diagnostika frontotemporální lobární degenerace	23
2 BIOMARKERY NEURODEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ..	25
2.1 AMYLOID B A PROTEIN TAU	26
2.2 NEUROGRANIN.....	26
2.3 GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN.....	27
2.4 A-SYNUKLEIN	27
2.5 MYELIN BASIC PROTEIN.....	27
2.6 NEUROFILAMENT LIGHT CHAIN	27
2.7 TAR DNA-BINDING PROTEIN 43	28
2.8 FUSED IN SARCOMA	28
2.9 MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN 1	28
2.10 VISININ LIKE PROTEIN 1.....	29
2.11 NEURON SPECIFICKÁ ENOLÁZA.....	29
2.12 TREM2	29
2.13 CHITINASE – 3 LIKE – PROTEIN-1	29
3 PŘIROZENÁ IMUNITA	32
3.2 PERIFERNÍ IMUNITNÍ BUŇKY	33
3.2.1 Mikroglie.....	34

3.2.2	Monocyty	36
3.2.3	Neutrofilly	37
3.2.4	NK buňky	38
3.2.5	Komplementový systém.....	38
4	ADAPTIVNÍ IMUNITA.....	40
4.1	T LYMFOCYTY	40
4.2	B LYMFOCYTY.....	42
4.3	AUTOPROTILÁTKY	42
5	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	44
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	45
6.1	METODA ELISA V SENDVIČOVÉM USPOŘÁDÁNÍ.....	46
6.1.1	Koutování desek.....	46
6.1.2	Vlastní provedení metody ELISA sendvičovou metodou.....	49
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	52
7.1	VÝSLEDKY STANOVENÍ PROTILÁTEK METODOU ELISA	53
7.1.1	Výsledky stanovení protilátek proti TREM2	53
7.1.2	Výsledky stanovení protilátek proti MCP-1	55
7.1.3	Výsledky stanovení protilátek proti α – synucleinu.....	56
7.1.4	Výsledky stanovení protilátek proti NFL.....	57
7.1.5	Výsledky stanovení protilátek proti MBP.....	57
7.1.6	Výsledky stanovení protilátek proti NSE.....	58
7.1.7	Výsledky stanovení protilátek proti TDP-43	59
7.1.8	Výsledky stanovení protilátek proti FUS.....	59
7.1.9	Výsledky stanovení protilátek proti amyloidu β	60
7.1.10	Výsledky stanovení protilátek proti neurograninu	60
7.1.11	Výsledky stanovení protilátek proti Chi3L1	61
7.1.12	Výsledky stanovení protilátek proti GFAP	62
7.1.13	Výsledky stanovení protilátek proti Tau 441	62
7.1.14	Výsledky stanovení protilátek proti VSN-1	63
8	ZÁVĚR.....	69
9	LITERÁRNÍ ZDROJE.....	70
10	PŘÍLOHY	83

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

<i>Obr. 1:</i> Znázornění korelace mezi dosud používanými biomarkery diagnostiky Alzheimerovy choroby a progresí onemocnění.....	20
<i>Obr. 2:</i> Proces odstraňování patogenního α – synukleinu pomocí přirozeně se vyskytujících specifických protilátek proti α – synukleinu při pasivní imunizaci	20
<i>Obr. 3:</i> Tvorba lézí z proteinu TDP-43	27
<i>Obr. 4:</i> Mikrotitrační deska se zastavenou enzymatickou reakcí pro ilustraci.....	54
<i>Tabulka 1:</i> Hodnoty autoprotilátek neurodegenerativních onemocnění podle dostupné literatury	32
<i>Tabulka 2:</i> Nakoutovaná deska s první skupinou antigenů.....	50
<i>Tabulka 3:</i> Nakoutovaná deska s druhou skupinou antigenů.....	50
<i>Tabulka 4:</i> Nakoutovaná deska s třetí skupinou antigenů.....	51
<i>Tabulka 5:</i> Příklad testovací mikrotitrační desky se vzorky.....	52
<i>Tabulka 6:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti v procentech pro TREM2.....	57
<i>Tabulka 7:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti pro TREM2.....	57
<i>Tabulka 8:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro MCP-1.....	58
<i>Tabulka 9:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro α – synuclein.....	59
<i>Tabulka 10:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro Nfl.....	59
<i>Tabulka 11:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro MBP.....	60
<i>Tabulka 12:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro NSE.....	61
<i>Tabulka 13:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro TDP-43.....	61
<i>Tabulka 14:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro FUS.....	62
<i>Tabulka 15:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro amyloid β	63
<i>Tabulka 16:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro neurogranin.....	63
<i>Tabulka 17:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro Chi3Li.....	64
<i>Tabulka 18:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro GFAP.....	64
<i>Tabulka 19:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro tau 441	65
<i>Tabulka 20:</i> Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro VSN-1.....	66
<i>Tabulka 21:</i> Výsledky Mann-Whitneyova testu, 1. část.....	67
<i>Tabulka 22:</i> Výsledky Mann-Whitneyova testu, 2. část.....	67

SEZNAM PŘÍLOH

<i>Tabulka 23:</i> Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro Alzheimerovu chorobu 1. část.....	96
<i>Tabulka 24:</i> Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro Alzheimerovu chorobu, 2. část.....	97
<i>Tabulka 25:</i> Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro frontotemporální lobární degeneraci, 1. část.....	98
<i>Tabulka 26:</i> Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro frontotemporální lobární degeneraci, 2. část.....	98
<i>Tabulka 27:</i> Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro Parkinsonovu chorobu, 1. část.....	99
<i>Tabulka 28:</i> Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro Parkinsonovu chorobu, 2. část.....	99
<i>Tabulka 29:</i> Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro vaskulární demenci, 1. část.....	99
<i>Tabulka 30:</i> Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro vaskulární demenci, 2. část.....	100
<i>Tabulka 31:</i> Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro negativí kontrolu, 1. část.....	100
<i>Tabulka 32:</i> Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro negativí kontrolu, 2. část.....	101
<i>Tabulka 33:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro TREM2.....	101
<i>Tabulka 34:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro MCP-1.....	102
<i>Tabulka 35:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro α -synuclein.....	102
<i>Tabulka 36:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro Nfl.....	103
<i>Tabulka 37:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro MBP.....	103
<i>Tabulka 38:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro NSE.....	104
<i>Tabulka 39:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro TDP-43.....	103
<i>Tabulka 40:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro FUS.....	105
<i>Tabulka 41:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro amyloid β	105
<i>Tabulka 42:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro NRG.....	106
<i>Tabulka 43:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro Chi3L1.....	106

<i>Tabulka 44:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro GFAP	107
<i>Tabulka 45:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro tau protein.....	107
<i>Tabulka 46:</i> Absolutní a řádkově relativní četnosti pro VSN-1	108

SEZNAM ZKRATEK

AN	Alzheimerova nemoc
APP	Amyloidový prekurzorový protein
A β	Amyloid β
BIC	Bikarbonátový pufr (z angl. Bicarbonate Buffer)
BSA	Hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumin)
CNS	Centrální nervový systém
ELISA	Enzymově značená imunoesej (z angl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
FTLD	Frontotemporální lobární degenerace
FUS	Fused in sarcoma
GFAP	Gliální fibrilární kyselý protein (z ang. Glial Fibrillary Acidic Protein)
H ₂ SO ₄	Kyselina sírová
HCl	Kyselina chlorovodíková
HRP	Křenová peroxidáza (z angl. Horseradish Peroxidase)
Chi3li	Chitin vázající protein (z angl. Chitinase - 3 - like Protein 1)
IgG	Imunoglobulin třídy G
IgM	Imunoglobulin třídy M
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
MBP	Myelinový bazický protein (z angl. Myelin Basic Protein)
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
NfL	Neurofilament light chain
NRG	Neurogranin
OD	Optická densita
PBS	Fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)
PBST	PBS s detergentem Tween
PD	Parkinsonova demence
PET/MRI	Pozitronová emisní tomografie s magnetickou rezonancí
PS-1 (2)	Presenilin 1 (2)
Sod1	Superoxid dismutáza
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

ÚVOD

Neurodegenerativní nemoci, zejména Alzheimerova choroba (dále jen AN), jsou nejčastějšími příčinami demence, ovlivňující desítky milionů seniorů po celém světě. Pacienti s těmito typy chorob typicky trpí progredující ztrátou paměti, zhoršujícím se vnímáním prostoru, mají problémy s vykonáváním běžných denních aktivit a trpí neuropsychiatrickými příznaky (Joe and Ringman, 2019). V posledních desetiletích byly popsány typické znaky Alzheimerovy choroby, jako jsou extracelulární amyloidové plaky, intracelulární neurofibrilární klubka tvořená tau proteinem a celková neurodegenerace mozku (Busche and Hyman, 2020). V roce 1991 převládala hypotéza představená Johnem Hardym (Hardy and Allsop, 1991), který považoval tvorbu amyloidních plaků za příčinu vzniku Alzheimerovy nemoci. Později se objevovaly nové teorie, které se snažily objasnit patogenezu vzniku AN, stejně jako dalších neurodegenerativních chorob. Uvažovalo se například o tom, že za vznikem AN stojí některé infekce, buněčné stárnutí, zvýšená tvorba tau proteinu nebo neuroimunomodulace (Corsetti et al., 2020).

V posledních letech ale přilákal pozornost výzkumníků fakt, že dysfunkce imunitního systému koreluje s progresí Alzheimerovy choroby. Data z klinických a experimentálních studií prokázaly, že imunitní buňky mohou během různých stádií nemoci podléhat významným dynamickým změnám (Jevtic et al., 2017). U mikroglíí, nejdůležitějších imunitních buněk přirozené imunity centrálního nervového systému, byly objeveny odlišné fenotypy během různých stádií choroby (Sarlus and Heneka, 2017). Další imunitní buňky vrozené imunity, jako jsou monocyty, makrofágy, neutrofilové a NK buňky, mohou vstupovat do CNS a podílet se na rozvoji Alzheimerovy choroby (Castellani and Schwartz, 2020).

Výskyt autoprotilátek zaměřených proti amyloidu β a přítomnost T buněk v mozkomíšním moku pacientů s AN mohou naznačovat potenciální vliv adaptivní imunity během rozvoje AN (Gate et al., 2020). Navíc, porucha glymfatického a meningeálního lymfatického systému v mozku může vyvolat kumulování amyloidu β a tau proteinu (Harrison et al., 2020). Metabolismus imunitních buněk pacientů s AN se také mění, což má dopad na patologii onemocnění (Butterfield and Halliwell, 2019). Kromě toho, nedávné studie ukázaly, že autoimunita je úzce spojená s Alzheimerovou chorobou, potažmo dalšími neurodegenerativními onemocněními (Lim et al., 2021). Přesto je porozumění toho, jak

spolu imunitní systém a patologie těchto onemocnění souvisí, zatím v začátcích. Pochopení fungování imunitního systému během rozvoje neurodegenerativních onemocnění by mohlo pomoci objevit nové terapeutické postupy v léčbě nebo zpomalení těchto chorob.

V této diplomové práci shrneme současné poznatky o nejrozšířenějších neurodegenerativních chorobách, o fungování imunitního systému během rozvoje těchto onemocnění, popíšeme roli imunitního systému ve vztahu k těmto chorobám, a také představíme vybrané biomarkery, které jsme v experimentální části práce testovali.

1 NEURODEGENERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ

1.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je onemocnění charakteristické postupným snižováním kognitivních funkcí doprovázené proteinovou neuropatologií. V počátečních fázích onemocnění dochází ke zhoršené schopnosti vybavovat si vzpomínky a později také ukládat nové. Následující progresse onemocnění způsobuje změnu osobnosti pacienta a dochází k atrofii mozku (Soria Lopez, 2019).

Rizikovým faktorem vzniku této choroby je především věk. Riziko vzniku AN exponenciálně vzrůstá, udává se, že největší incidence je po 85. roce života. V nedávných výzkumech se ukázalo, že imunitní systém také hraje důležitou roli v patogenezi Alzheimerovy choroby. U těchto pacientů a pacientů s jinými formami neurodegenerace byly totiž objeveny autoprotilátky proti vlastním proteinům. To naznačuje, že hladina těchto protilátek by mohla být slibným biomarkerem pro diagnostiku těchto onemocnění (Wu & Li, 2016).

1.1.1 Patofyziologie Alzheimerovy choroby

Při Alzheimerově chorobě dochází ke ztrátě synaptické plasticity a synapsí samotných, což koreluje právě se snižováním kognitivních funkcí. Ztráta synapsí a dendritických trnů je spojována s odstraňováním postsynaptických receptorů amyloidem- β . Tyto postsynaptické receptory jsou nezbytné pro účinek amyloidu- β na synapsích (Muller et al., 2018).

Amyloidové plaky, které se hromadí v mozkové tkáni pacientů, vznikají tak, že amyloid- β , který vzniká rozkladem APP, není dostatečně rychle rozkládán a odbouráván anebo je naopak tvořen příliš. V těchto alzheimerovských placích vzniká zánět, který aktivuje mikroglie a astrocyty. Dochází tím k uvolnění cytokinů a volných kyslíkových radikálů, které způsobují další degenerativní změny peroxidací lipidů buněčných membrán neuronů, které odumírají (Chandoga et al., 2013). Přesnější vysvětlení, jak mikroglie přispívají k neurodegeneraci, bude popsán v kapitole 6.1.1 Mikroglie.

Tau proteiny jsou neuronální proteiny, které mají domény, kterými se váží na mikrotubuly. Jsou tak zodpovědné na polymerizaci a stabilizaci mikrotubulů a zajišťují stabilitu cytoskeletonu. Vázání na mikrotubuly je regulováno fosforylací reziduí serinu nebo threoninu kinázami. Cyklin – dependentní kináza (CDK5) se považuje za potenciálního iniciátora vytváření neurofibrilárních klubek. Amyloid β aktivuje kalpain, čímž se dereguluje aktivátor CDK5. Ta se hyperaktivuje, což vede k hyperfosforylaci tau proteinu a ten se stává málo afinitní pro mikrotubuly. Tento hyperfosforylovaný tau vytváří neurofibrilární klubka a ukládá se v cytosolu a už dále neudrží strukturu buněk. Navíc, toto ukládání ovlivňuje normální funkce buněk a ta pomalu degeneruje (Khan et al., 2020).

1.1.2 Diagnostika Alzheimerovy choroby

Diagnostika demence je důležitá především proto, aby se rozlišilo, o jaký typ onemocnění se jedná a aby mohla být nasazena správná terapie (Olsson et al., 2016). K diagnostice Alzheimerovy choroby se standardně využívají kognitivní testy, zobrazovací techniky MRI a PET scan a biochemická diagnostika (Dubois et al., 2007). Biomarkery, které se v současné době používají k diagnostice jsou koncentrace amyloidu- β , proteinu tau a fosforylovaného tau proteinu v mozkomíšním moku (Olsson et al., 2016). Na obrázku č. 1 můžeme vidět korelaci mezi hodnotami biomarkerů a zobrazovacími technikami. Z obrázku je patrné, že laboratorní diagnostika je významná především v předpovědi progresu onemocnění a přináší přesnější informace než zobrazovací metody.

1.1.2.1 Koncentrace amyloidu β ($A\beta$)

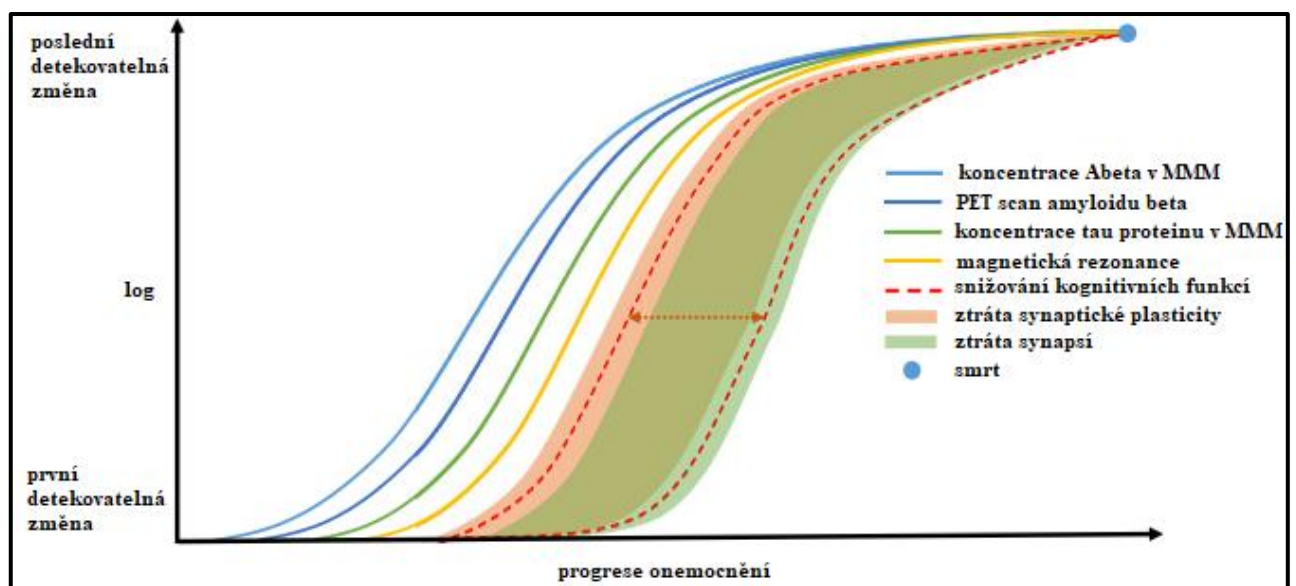
Amyloid β je protein, který vzniká z prekurzorového proteinu APP (*amyloidový prekurzorový protein*). APP se za normálních okolností štěpí enzymem alfa-sekretázou a vznikají fragmenty o délce 40 aminokyselin. Ty přispívají k neuroplasticitě mozku. Pokud se ale stane, že je APP štěpen β nebo γ -sekretázou, vznikají fragmenty o délce 42 (případně 43) aminokyselin, které se shlukují a polymerují v nerozpustný β -amyloid. Ten se ukládá v šedé kůře mozkové poblíž nervových vláken, výběžků gliových buněk a synapsí a

vznikají alzheimerovské (neuritické) plaky. V těchto místech dochází k neurodegeneraci a odumírání neuronů a neurozánětu (Zetterberg et al., 2010).

1.1.2.2 Koncentrace tau proteinu

Bylo zjištěno, že koncentrace tau proteinu v plazmě je u pacientů s Alzheimerovou chorobou významně vyšší než v kontrolní skupině lidí vyloučenou demencí. Díky tomu je možné tento biomarker využít pro odlišení pacientů s Alzheimerovou chorobou nebo mírnou kognitivní poruchou od zdravých osob (Chiu et al., 2014). Měření tau proteinu v mozkomíšním moku se dokonce ukázalo jako spolehlivý biomarker pro predikci postupu mírné kognitivní poruchy do Alzheimerovy choroby (Andersson et al., 2008).

Pro získání mozkomíšního moku je zapotřebí invazivní lumbální punkce. U amyloidu β i proteinu tau je možné lumbální punkci nahradit zobrazovacími metodami, pomocí kterých můžeme sledovat amyloidní plaky nebo neurofibrilární klubka v mozku.



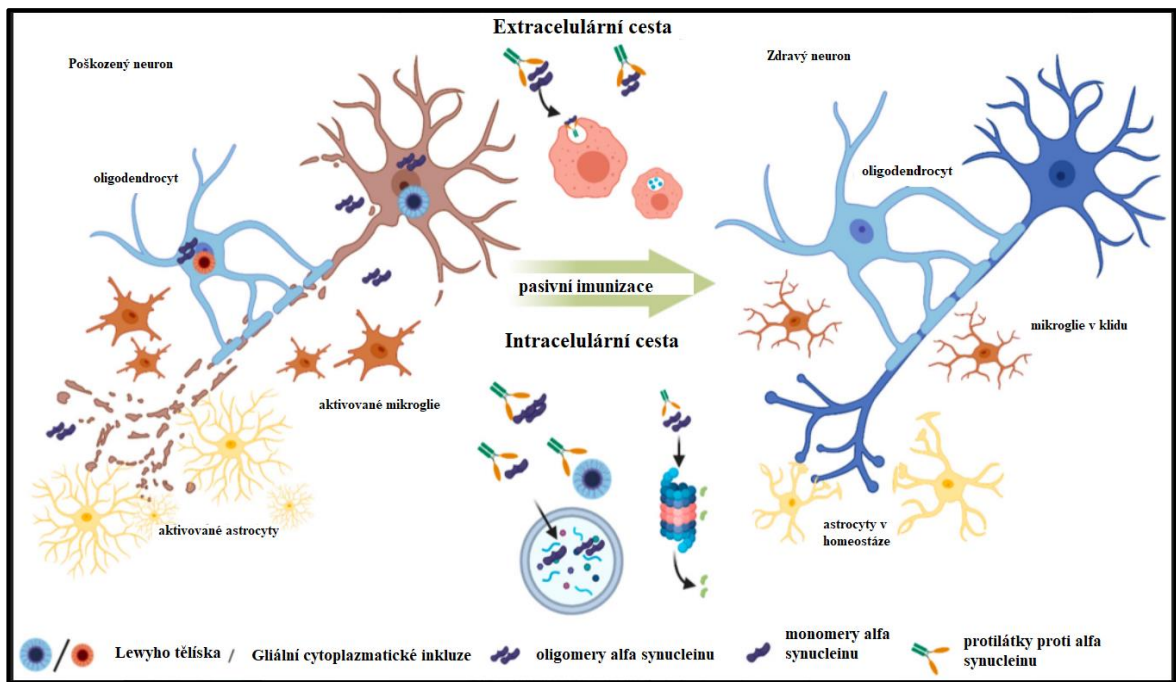
Obr. č. 1: Znázornění korelace mezi dosud používanými biomarkery diagnostiky Alzheimerovy choroby a progresí onemocnění. Podle obrázku je vidět, že kognitivní úpadek koreluje se změnami v synaptické plasticitě a pravděpodobně tomu předchází ztráta synapsí. Na rozdíl od synaptické plasticity, MRI a PET amyloidu β a tau proteinu jsou schopny předpovídat kognitivní pokles s menší přesností (převzato a upraveno dle Soría Lopéz et al., 2019)

1.2 Parkinsonova demence

Parkinsonova demence (dále jen PD) je druhé nejčastější progresivní neurodegenerativní onemocnění po Alzheimerově chorobě. Je charakterizováno mototrickými symptomy, jako je klidový třes a bradykinéze, ale i nemotorickými symptomy, například snižování kognitivních funkcí, deprese, úzkosti nebo potíže se spánkem.

1.2.1 Patofyziologie Parkinsonovy demence

Typickým patofyziologickým znakem u Parkinsonovy demence je depigmentace a ztráta neuronů v oblasti substantia nigra a locus coeruleus. Pomáhá tomu apoptóza buněk a autofágie. V těchto postižených místech vznikají tzv. Lewyho tělíska, což jsou eosinofilní cytoplazmatické léze obsahující protein α -synuklein, podobně jako se u Alzheimerovy choroby hromadí amyloid- β a vznikají alzheimerovské plaky. Přítomnost Lewyho tělísek se považuje za typickou známku zániku neuronů u Parkinsonovy demence. Tato tělíska můžeme ale najít i u jiných forem demence, především u demence s Lewyho tělísky, ale také v senilních placích u AN (Roth et al., 1999). Primární příčina vzniku PD však zůstává stále nejasná, současné teorie mluví o dysfunkci mitochondrií, neurozánětu nebo oxidativním stresu (Hayes, 2019). Na obrázku č. 2 můžeme vidět, jak α -synuklein ovlivňuje prostředí v mozku a jakým způsobem organismus reaguje na jeho ukládání.



Obr. č. 2: Proces odstraňování patogenního α – synucleinu pomocí přirozeně se vyskytujících specifických protilátek proti α – synucleinu při pasivní imunizaci. U synucleinopatií se patogenní druhy α – synucleinu (proto/fibrilární nebo oligomerní) akumulují a spouštějí mikroglální a astrocytární aktivaci (převzato a upraveno dle Folke et al., 2022)

1.3 Vaskulární demence

Vaskulární demence je typ neurodegenerace, která je způsobená mnoha faktory, jako je pokročilý věk pacienta, vaskulární choroby typu ateroskleróza, mikroinfarkty a angiopatie amyloidu β , kdy se β -amyloid ukládá v cévách mozku (Wolters and Ikram, 2019).

1.3.1 Diagnostika vaskulární demence

Protože příčinou vzniku vaskulární demence je cévní poškození mozku, může po infarktech dojít ke zhoršení kognitivních funkcí, případně až k demenci. K diagnostice se využívají zobrazovací metody, kde lze vidět nitrolební krvácení korelující s nástupem příznaků demence. Laboratorně se tato choroba diagnostikuje pomocí běžných testů pro sledování neurodegenerace, tedy stejně jako v případě Alzheimerovy choroby (Biessels, 2016).

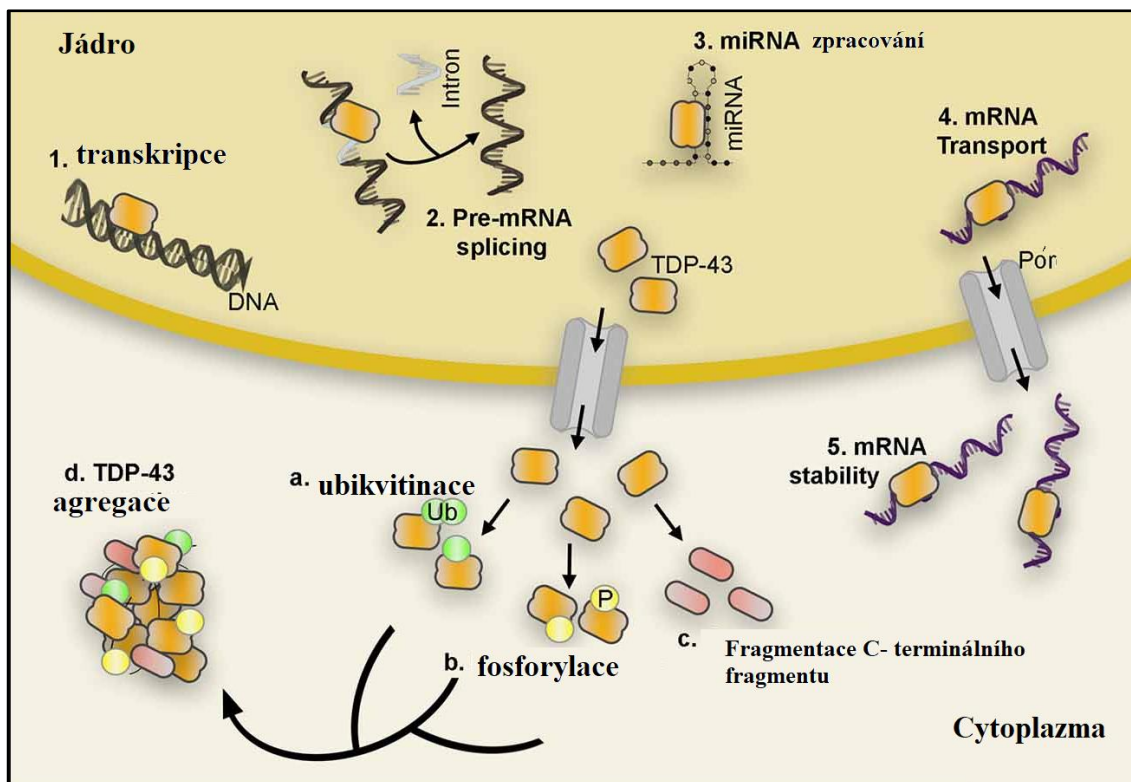
1.4 Frontotemporální lobární degenerace

Frontotemporální lobární degenerace reprezentuje jednu z nejčastějších forem demence u lidí mladších 65 let a objevuje se díky progresivní neurodegeneraci frontálních a frontotemporálních laloků mozku. Projevy této choroby mohou být různé, od změn chování a osobnosti k problémům s vyjadřováním a řečí. U některých pacientů dochází také k motoneurologickým projevům nemoci. Příčinou těchto změn je ztráta neuronů (Sirkis, et al., 2019).

O frontotemporální lobární demenci můžeme uvažovat jako o tautopatii, ubiquitinopatii anebo choroby bez specifického histologického obrazu podle toho, která bílkovina zapříčinila rozvoj neurodegenerace. Typickým proteinem, který u FTLD vytváří plaky je TDP-43 (Rektorová, 2006). Více o tomto proteinu bude uvedeno v kapitole 2 Biomarkery.

1.4.1 Diagnostika frontotemporální lobární degenerace

Pro potvrzení frontotemporální lobární demence se využívají především zobrazovací techniky, protože protein TDP-43 vytváří v mozku inkluze, které lze takto sledovat. Typicky používaným biomarkerem jsou hodnoty proteinu TDP-43, jehož hodnota je v mozkomíšním moku pacienta zvýšena, stejně jako hodnota fosforylovaného tau proteinu a FUS. Na obrázku č. 3 můžeme vidět, jakým způsobem v mozku vznikají léze z proteinu TDP-43.



Obr. č. 3: Tvorba lézí z proteinu TDP-43. TDP-43 je zodpovědný za řadu funkcí, jako je zahájení transkripce, sestřih pre-mRNA, zpracování miRNA, transport a stabilitu mRNA. Z apatologických stavů se však funkční TDP-43 vyčerpává z jadra buňky a hromadí se v cytoplazmě v hyperfosforylovaných ubikvitinovaných formách, které vytvářejí charakteristické proteinopatie u frontotemporální lobární degenerace (převzato a upraveno podle De Mena et al., 2021)

2 BIOMARKERY NEURODEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ

Biomarkery jsou popisovány jako látky, které mohou být měřeny v krvi, séru, moči nebo v dalších tělních tekutinách za účelem objektivního zhodnocení jejich biologické aktivity jako indikátoru fyziologických a patologických procesů v organismu. Musí být nejen dostatečně specifické, ale také senzitivní pro dané onemocnění, abychom mohli spolehlivě určit, že diagnostický test chorobu potvrdil, případně vyvrátil (Strimbu & Tavel, 2010).

V současné době se rutinně využívá několik biomarkerů specifických pro nejrozšířenější neurodegenerativní onemocnění, která jsme popsali výše. Snahou výzkumníků ovšem je, objevit takový biomarker nebo jejich kombinaci, který by nemoc odhalil ideálně dříve, než se u pacientů rozvinou klinické příznaky. Ideální biomarker je specifický právě pro onu danou chorobu nebo skupinu chorob a diagnostický test používající tento biomarker by měl být levný, rychlý a snadno použitelný.

Jak jsme si popsali výše, společným znakem neurodegenerativních onemocnění je tvorba proteinových plaků z různých druhů proteinů. Z hlediska imunitního systému se tyto proteiny chovají jako antigeny a aktivují imunitní systém, který proti nim vytváří protilátky. A protože se jedná o protilátky proti vlastním proteinům, mluvíme o autoprotilátkách. Autoprotilátky jsou sledovány nejen z důvodů objasnění etiologie neurodegenerativních chorob, ale i jako potenciální biomarkery.

Biomarkery, které budou v následující kapitole popsány, byly vybrány do této práce vzhledem k jejich funkci a lokalizaci v centrálním nervovém systému a jejich vztahu k výše popsaným chorobám. Některé z nich jsou v současné době už rutinně používané jako biomarkery neurodegenerativních onemocnění, u některých zatím nejsou známy hodnoty, jakých by jako biomarkery měly dosahovat. V našem případě se jedná o testování, zda by se mohly uplatnit při diagnostice ze séra pacientů. Hledali jsme tedy protilátky v séru pacientů proti následujícím antigenům, protože jejich zvýšená hodnota by naznačovala jejich potenciální využití jako biomarkerů.

2.1 Amyloid β a protein tau

Jak jsme již uváděli, pacienti s Alzheimerovou chorobou mají v mozku patrné amyloidové plaky a neurofibrilární klubka, tvořeny dvěma hlavními biomarkery a pro náš výzkum antigeny, jsou tedy amyloid β a protein tau. Rutinně se jejich koncentrace měří v mozkomíšním moku. Hodnoty celkového a specificky fosforylovaného tau proteinu jsou v porovnání s kontrolní skupinou bez neurodegenerace zvýšené a koncentrace amyloidu β je v mozkomíšním moku oproti kontrolám snižena (de Souza et al., 2012).

Bartos et al. prokázali autoprotiilátky proti tau proteinu a β -amyloidu v krvi i v mozkomíšním moku (Bartos et al., 2012). Konkrétně objevili zvýšené hladiny autoprotiilátek proti peptidu β -amyloidu 1-42 a fragmentu 25-35 a jeho oligomerům. Přítomnost těchto autoprotiilátek se zdá být spolehlivým biomarkerem pro detekci Alzheimerovy choroby při diagnostice z mozkomíšního moku (Maftai et al., 2013). Stejně tak autoprotiilátky proti proteinu tau, které se váží na jeho fragmenty obsahující domény vázající mikrotubuly (Pascual et al., 2017).

Tyto autoprotiilátky však byly nalezeny a jsou spojovány i s dalšími demencemi jako je frontotemporální lobární degenerace nebo demence s Lewyho tělísky. Jejich koncentrace se ale liší ve srovnání s koncentracemi u pacientů s Alzheimerovou chorobou, a navíc mají tyto demence jiné specifické markery (Maetzler et al., 2011).

Tau protein i amyloid β se v současné době s úspěchem využívá pro diagnostiku akutního výskytu Alzheimerovy demence, ale bohužel mají nízkou prognostickou hodnotu. Bylo zjištěno, že ztráta synapsí odpovídá lépe snižování kognitivních funkcí, a proto probíhají výzkumy s proteinem neurograninem, který by díky svojí lokalizaci a funkci v CNS, mohl pomoci s predikcí snižování kognitivních funkcí u pacientů.

2.2 Neurogranin

Neurogranin je malý protein exprimovaný v pyramidových buňkách hippocampu a kortexu. Přesto, že jeho diagnostická hodnota zatím není plně známá, ze studií plyne, že koncentrace neurograninu v mozkomíšním moku výrazně stoupá bezprostředně po kumulaci β -amyloidu, což podporuje teorii, že u pacientů s Alzheimerovou nemocí dochází ke ztrátě synapsí brzy po propuknutí nemoci a že neurogranin by tedy mohl být dobrým biomarkerem pro sledování ztráty synapsí (Simrén et al., 2020). Podílí se na synaptické

plasticitě a regeneraci díky jeho vazbě na kalmmodulin (De Vos et al., 2015, Kvartsberg et al., 2015).

2.3 Glial fibrillary acidic protein

GFAP (*gliální fibrilární kyselý protein, glial fibrillary acidic protein*) je dobře zavedený astrocytový biomarker pro diagnózu a monitorování traumatu mozku. Je to hlavní proteinová složka gliálních filament, jehož exprese na astrocytech se zvyšuje jako odpověď na poškození mozku. Podle studií je zvýšená hodnota GFAP dobrým biomarkerem pro rozlišení takovýchto pacientů od kontrolních vzorků (Zwirner, 2021).

2.4 α -synuklein

α -synuklein je protein přítomný ve vysokých koncentracích v presynaptických nervových zakončeních. Je spojován s patofyziologií Parkinsonovy choroby, dochází totiž ke kumulaci jeho chybně poskládaných oligomerů do tzv. Lewyho tělísek. **α -synuklein** je významný především v synaptickém přenosu. Je exprimován v neuronech v oblasti axonu, hippocampu i gliových buňkách. Interaguje s tyrosinhydroxylasou, která se díky tomu nemůže hydrolyzovat, a proto dochází ke snížené tvorbě dopaminu (Smith, 2012).

2.5 Myelin basic protein

MBP (*Myelin basic protein*) je protein v myelinu centrální nervové soustavy. Reakcí s dalšími proteiny a záporně nabitými lipidy získává strukturu. Umí vázat aktin, membránový protein, díky čemuž se aktivně účastní extracelulárních signálů v oligodendrocytech a tight junctions v myelinu (Boggs, 2006).

2.6 Neurofilament light chain

Neurofilamenty jsou vysoce fosforylované neuronální cytoskeletonové komponenty udržující strukturu neuronů. NfL (*Neurofilament light chain*) je 68 kDa veliký protein, který je uvolňován do extracelulární tekutiny v případě poškození axonů. Podle studií se zdá, že hodnoty NfL v mozkomíšním moku korelují se stupněm poškození axonů u neurogenerativních onemocnění (Mollenhauer, 2020).

2.7 TAR DNA-binding protein 43

Protein vázající DNA transaktivní odezvy, **TDP-43** (*TAR DNA-binding protein 43*), je intranukleární protein kódovaný genem TARDBP, který se podílí na sestřihu RNA, transportu, stabilizaci a tím i regulaci genové exprese. Cytoplazmatická inkluzní tělíska obsahující fosforylované a zkrácené formy TDP-43 jsou charakteristickým znakem amyotrofické laterální sklerózy a podskupiny frontotemporální lobární degenerace (Gao et al., 2019).

Inkluze TDP-43 byly také nalezeny až v 57 % případech Alzheimerovy choroby, kdy se v některých případech depozita TDP-43 nacházejí v neuronech i s neurofibrilárními klubky. Podle studií mají pacienti s AN s TDP-43 patologií větší kognitivního poškození ve srovnání s pacienty bez patologie TDP-43. Navíc, nejběžnější genetický rizikový faktor pro AN, apolipoprotein E4, je spojen se zvýšenou frekvencí patologie TDP-43. Tato zjištění ukazují, že patologie TDP-43 je nedílnou součástí mnoha neurodegenerativních chorob (Meneses et al., 2021).

2.8 Fused in sarcoma

Dalším sledovaným proteinem je FUS (*RNA-binding protein FUS, Fused in sarcoma*). FUS je protein, který váže RNA/DNA a je součástí různých buněčných procesů, například transkripce. Podílí se tedy na regulaci genů, opravě DNA a celkově na udržování genomické stability. Teorie je, že pokud FUS sekvstruje důležité regulátory transkripce nebo spustí abnormální signální dráhy, dojde ke změnám fyziologie buněk. Nebo se agregací FUS proteinu „vyčerpají“ funkční zásoby FUS, což způsobí nestabilitu mRNA a spustí imunitní odpověď s tvorbou zánětu, a to způsobí další poškození neuronů. Vyčerpání funkčního FUS tedy vede k neurodegenerativnímu onemocnění (Chen et al., 2019).

2.9 Monocyte chemoattractant protein 1

MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) je klíčový mediátor chemotaxe monocytů a diferenciací T lymfocytů. Je produkován množstvím buněk, jako jsou monocyty, makrofágy, endotelové buňky, buňkami hladkého svalstva, ale také buňkami v mozku, jako jsou astrocyty a mikroglie. Exprese MCP-1 je podporována prozánětlivými cytokiny IL-1, IL-4, TNF-alfa, IFN-gama a dalšími. Po vazbě MCP-1 na receptor CCR2

dochází k imunitní odpovědi vrozené části imunitního systému, ten vyšle monocyty do místa zánětu. Navíc má MCP-1 svoji funkci i v adaptivní imunitě, kontroluje totiž preferenci diferenciaci Th lymfocytů na Th1 nebo Th2 fenotyp (Bianconi, 2017).

2.10 Visinin like protein 1

VSN-1 (*Visinin like protein 1*) je specifický protein v neuronech, který funguje jako senzor vápníku. Je vysoce exprimovaný v centrálním nervovém systému a vstupuje do mozkomíšního moku po zranění mozkových buněk, jako je mrtvice nebo neurodegenerativní onemocnění. Přítomnost autoprotilátek proti VSN-1 indikuje poškození neuronů a mikroglální aktivaci (Tan, 2020).

2.11 Neuron specifická enoláza

NSE neboli neuron specifická enoláza se nejvíce nachází v neuronech, ale také v cytosolu neuronálních buněk, jako jsou astrocyty a gliální buňky. Je to jeden ze tří izoenzymů enolázy, která se podílí na glykolytickém cyklu konverzí 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát. Má se za to, že NSE hraje roli v neurodegenerativním procesu, protože jeho uvolnění do extracelulárního prostoru, podpořené například ukládáním amyloidu β , vede k aktivaci mikroglíí. Je to tedy další z antigenů, který odráží mikroglální aktivaci (Janković & Djordjijević).

2.12 TREM2

O funkci tohoto proteinu bude více pojednáno v kapitolách o imunitním systému, konkrétně v kapitole 3.1.1 Mikroglie.

2.13 Chitinase – 3 like – protein-1

Chi311 (Chitinase – 3 like – protein-1) nebo také YKL-40, je primárně protein exprimovaný na astrocytech a kódovaný genem Chi311. V současné době je to široce studovaný biomarker, jehož koncentrace se v mozkomíšním moku zvyšuje s věkem a také brzy po propuknutí Alzheimerovy choroby. Nicméně, jeho funkce v patogenezi nemoci zůstává nejasná. V nedávné studii bylo zjištěno, že delece genu kódující Chi311 snížila

amyloidovou zátěž a kumulaci amyloidu β a naopak zvýšila expresi mikrogliaálního lysozomálního markeru CD68, což naznačuje, že by Chi3L1 mohla potlačovat gliální fagocytovou aktivaci a podporovat akumulaci amyloidu β (Lananna et al., 2020).

Zde uvádíme tabulku, která shrnuje výše uvedené dosud objevené hodnoty autoprotilátek u jednotlivých demencí v séru. Jak se nám povedlo tyto hodnoty ověřit, uvedeme v kapitole 8 Závěr.

Tabulka 1: Souhrn hodnot autoprotilátek neurodegenerativních onemocnění podle dostupné literatury, zpracováno podle kapitol 2.1 – 2.13 z kapitoly 2 Biomarkery

PROTILÁTKY PROTI	AN	FTLD	PD	VD	Zdroj
Aβ42	snížené nebo stejná hodnota	neznámé	zvýšené	neznámé	Maftai et al., 2013
					Bartos et al., 2012
Aβ40	neznámé	neznámé	neznámé	neznámé	
Tau protein	snížené nebo stejná hodnota	neznámé	Nižší než kognitivně normální pacienti	neznámé	Pascual et al., 2017
					Maetzler et al., 2011
α-synuclein	zvýšené	zvýšené	Snížené, zvýšené, nebo stejná hodnota	neznámé	Smith et al., 2012
FUS	neznámé	neznámé	neznámé	neznámé	
VSN-1	neznámé	neznámé	neznámé	neznámé	
NFL	Stejná hodnota	neznámé	neznámé	neznámé	Mollenhauer et al., 2021
TREM2	neznámé	neznámé	neznámé	neznámé	
MBP	zvýšené	zvýšené	zvýšené	neznámé	Boggs et al., 2006
GFAP	zvýšené	neznámé	Stejná hodnota	zvýšené	Zwirner et al., 2021
Chi3li	neznámé	neznámé	neznámé	neznámé	
MCP-1	neznámé	neznámé	neznámé	neznámé	
Neurogranin	neznámé	neznámé	neznámé	neznámé	

Na začátku práce jsme uváděli, že z hlediska imunitního systému lze pohlížet na neurodegenerativní choroby jako na autoimunitní onemocnění, protože jsou v tělních tekutinách pacientů detekovány autoprotiátky proti vlastním proteinům. A proto v dalších kapitolách shrneme dosavadní poznatky o fungování imunitního systému v centrální nervové soustavě a popíšeme roli jednotlivých imunitních buněk v boji s neurodegenerativními změnami.

3 PŘIROZENÁ IMUNITA

Přirozená imunita představuje první linii v boji proti patogenům a její odpověď na ně je zahájena v případě, že jsou molekulární struktury na jejich povrchu (PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*) rozpoznány specifickými receptory rozpoznávajícími tyto struktury (PRRs – *Pattern recognition receptors*). PRR jsou přítomné na povrchu bílých krvinek a řadíme mezi ně Toll-like receptory, Nod-like receptory, scavenger receptory, ale také manózoový a galaktózoový receptor (Chiarini et al., 2020).

PAMPs patří k exogenním signálům odvozených od mikroorganismů (Zindel and Kubes, 2020). Bylo reportováno, že několik druhů mikroorganismů, včetně HSV-1, HHV-6, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia pneumoniae* a *Porphyromonas gingivalis* zvyšují šanci vzniku AD (Beffert et al., 1998). Přesto, že nedávné epidemiologické výzkumy ukázaly, že mikrobiální agens jsou spouštěči imunitní odpovědi v mozku a ta může přispívat k rozvinutí demence, vztah mezi infekcemi a neurologickými chorobami zůstává kontroverzní (Readhead et al., 2018).

Naproti tomu, DAMPs jsou signály, které vytvářejí umírající buňky za stresových podmínek (Zhang et al., 2013). Venegas a Heneka tvrdí, že se proteiny, které byly objeveny v nadměrném množství u pacientů s demencí, jako je HMGB1 (*high mobility group box 1*), S100, chromogranin, heat shock proteiny a také amyloid β a tau klubka, mohou chovat jako DAMPs (Venegas and Heneka, 2017).

V nedávné době byl objeven nový spouštěč imunitní odpovědi vrozené imunity u pacientů s Alzheimerovou chorobou, nazývaný se HAMPs (*homeostasis-altering molecular processes - molekulární procesy měnící homeostázu*) (Liston and Masters, 2017). Na rozdíl od DAMPs a PAMPs, HAMPs nejsou molekulové vzorce, ale spíše výsledky buněčné nerovnováhy. Například, inflamazóm skládající se z NACHT, LRR a PYD-domény obsahující protein 3 (NLRP3) je považován za důležitý typ PRR na imunitních buňkách v průběhu AN (Feng et al., 2020). NLRP3 umí rozpoznat jakékoliv podmínky, které způsobují ztrátu homeostázy a přímo tak spouští senzor inflamazomu pyrin. Autoři studie (Liston and Masters, 2017) tvrdí, že pyrin zprostředkovává

rozpoznávání HAMPs a přispívá tak k aktivaci NLRP3 inflamazomy. Podle této teorie se amyloidové plaky, hyperfosforylovaný tau protein a mitochondriální oxidativní stres chovají jako HAMPs a spouští tak aktivaci NLRP3 inflamazomu prostřednictvím HAMPs.

PRR jsou senzory přirozené imunity a regulují aktivaci imunitních buněk při odpovědi na signály nebezpečí a stimulují uvolnění zánětlivých mediátorů (Lee and Kim, 2007). Mezi nejdůležitější PRR patří scavenger receptory (SRs), Toll-like receptory (TLRs), NOD-like receptory (NLRs), a také bílkovina nazvaná „spouštěcí receptory exprimované na myeloidních buňkách (TREM)s (Miklossy, 2016). SRs a TLRs reagují na signály nebezpečí a spouští tak reakci, jejímž výsledkem je aktivace nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B) a uvolnění prozánětlivých cytokinů IL-1 β , respektive IL-18 (Heneka et al., 2018). TREM2 se váže na DNAX aktivující protein (DAP12), který nese imunoreceptor ITAM (tyrosine-based activation motif) a tím negativně reguluje imunitní odpověď vrozené imunity (Dezckowska et al., 2020). Prozánětlivé cytokiny uvolněné imunitními buňkami indukují aktivaci imunitního systému a zesilují její odpověď (Chitnis and Weiner, 2017). Správná kontrola imunitních odpovědí je zásadní pro udržení homeostázi. U pacientů s neurodegenerativními chorobami bylo pozorováno, že jejich imunitní buňky byly neustále a přehnaně aktivovány, což potenciálně vyústilo v kumulování amyloidu β a proteinu tau, ztrátě synapsí a v konečném důsledku v neurodegeneraci (Hartnell et al., 2021). Z tohoto důvodu je důležité znát procesy fungování imunitního systému v průběhu neurodegenerativních chorob, aby bylo možné najít nové terapeutické možnosti na tyto zatím neléčitelné nemoci.

3.2 Periferní imunitní buňky

Mozek je považován za imunologicky privilegovaný orgán díky existenci hematoencefalické bariéry a periferní imunitní buňky jsou v mozkovém parenchymu detekovány zřídka (Prinz and Priller, 2017). Nicméně, nejnovější data z klinických a experimentálních studií uvádějí, že periferní imunitní buňky, včetně monocytů, makrofágů a neutrofilů modelují zánětlivé odpovědi u Alzheimerovy choroby (Ennerfelt and Lukens, 2020a).

V pokusech s AD transgenními myšmi bylo zjištěno, že amyloid β derivovaný mozem může proudit do periferie skrze hematoencefalickou bariéru, lymfatické cesty a

arachnoidní granulový venous sinus (Cheng et al., 2020). Je odhadováno, že až 60 % amyloidu je z periferií odstraňováno právě pomocí imunitních buněk (Dionisio-Santos et al., 2019).

Zde uvádíme přehled periferních imunitních buněk a jejich rolí při vzniku Alzheimerovy choroby jako zástupce nejsledovanější neurodegenerativní choroby.

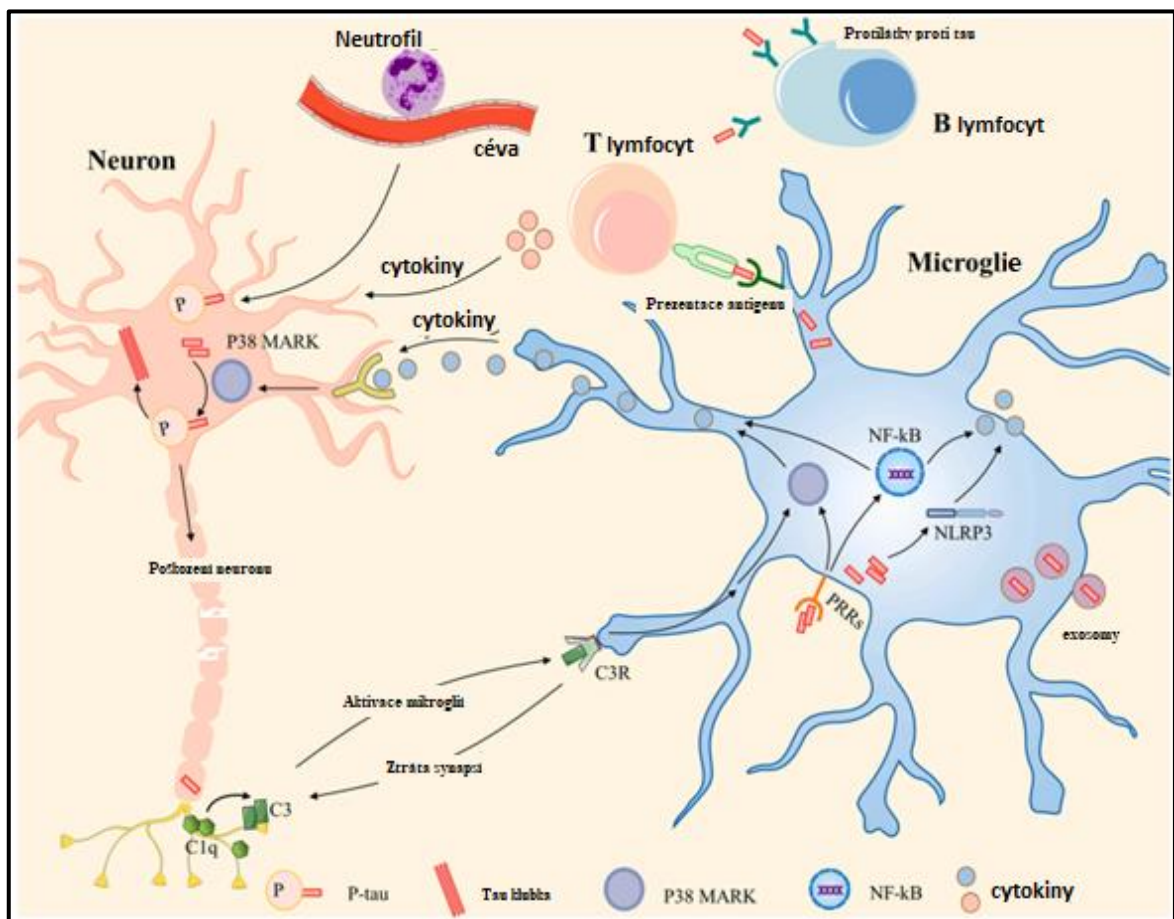
3.2.1 Mikroglie

Mikroglie tvoří až 12 % buněk centrální nervové soustavy. Jsou to hlavní imunitní buňky mozku a podílejí se na udržování homeostázi a obraně proti patogenům (Ransohof and El Khoury, 2015). Jedna z hlavních fyziologických funkcí mikroglíí, nazvaná „údržba“ (*housekeeping*), je jev, kdy mikroglie monitorují svoje okolí, vyhodnocují ho a migrují do míst, kde dochází k degradaci neuronů za účelem fagocytózy. Udržují tak homeostázu mikroprostředí, ale také myelinu (Healy et al. 2016).

Mechanismy, kterými mikroglie ničí neurony, jsou častým tématem studií. Na obrázku č. 4 můžeme vidět, jakými mechanismy jsou mikroglie aktivovány a jak to posléze ovlivňuje neurony. Když jsou aktivované ligandy jako jsou infekční patogeny, amyloid β , infekční prionová bílkovina (PrPSc) nebo agregovaný α -synuclein, NADPH produkuje superoxid, který je uvolněn a přeměněn na peroxid vodíku extracelulární superoxid dismutázou nebo reaguje s NO a vytváří peroxynitrit (Simonian and Coyle, 1996). To způsobuje nekrózu buněk (Simonian and Coyle, 1996) nebo apoptózu (Brown and Vilalta, 2015). Mikroglie také způsobují degradaci neuronů jednak přílišnou expresí iNOS (*indukovatelných NO synthás*) anebo přímým uvolňováním glutamátu (Maezawa and Jin, 2010). Mikroglialní proteázy jako jsou katepsiny, jsou uvolňovány jako odpověď na amyloid β , což vede k apoptóze neuronů (Gan et al., 2003) a metalloproteázy v matrix mohou způsobovat hypoxii a ischemii neuronů (Leonardo et al, 2009). Mikroglie mohou také způsobovat ztrátu neuronů nepřímo, a to uvolňováním TNF (*tumor necrosis factor*) anebo sníženou produkcí BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) a IGF (*insulin-like growth factor*) a tím zvýšení apoptózy neuronů (Brown and Vilalta, 2015).

Je tedy evidentní, že mikroglie se za určitých okolností mohou stát ničiteli vlastních neuronů. Mají ale několik imunologických kontrolních bodů nebo mechanismů, které

zabraňují jejich přehnané reakci na externí stimuly. Mezi tyto řadíme Trem2, sledování Cx3cr1-fraktalkinů a „uklízecí“ funkce mikroglíí, které slouží ke kontrole zánětlivých odpovědí, a SR mechanismus, který podporuje odstraňování (*clearance*) škodlivých podnětů. Dysregulace některého z těchto mechanismů iniciuje nebo zhoršuje průběh neurodegenerace.



Obr. č. 4: Přehled interakcí imunitních buněk s tau proteinem. Na obrázku je znázorněno, jakým způsobem dochází k aktivaci mikroglíí a jak tato aktivace ovlivňuje neurony (převzato a upraveno podle Wu et al, 2021)

Mikroglie zprostředkovávají obranu hostitele proti infekčním patogenům, škodlivým vlastním proteinům jako je amyloid β , agregovaný α -synuclein, mutantní huntingtin, ale také primární nebo metastatické tumory CNS. V reakci na tyto antigeny, mikroglie exprimují Fc receptory, Toll-like receptory, virální receptory a antimikrobiální peptidy (Hickman, et al., 2013). Můžou také zahájit prozánětlivou odpověď produkcí cytokinů, jako je TNF a IL-1 (Hickman, et al., 2008) a pravděpodobně chemokinu Ccl2 (El Khoury et al. 2007), který přitáhne další buňky a vyvolá tak zničení škodlivých látek a tím

udržení homeostázi v mozku. Přetrvávající neuroinfekce může vést k neurotoxicitě a tím k neurodegeneraci.

Scavenger receptory jsou PRRs vrozené imunity, které podporují odstraňování cizorodých nebo vlastních pozměněných látek (PrabhuDas et al., 2017). SR-A1 je fagocytový receptor exprimovaný na mikroglíích, které obklopují plaky amyloidu β (Frenkel et al, 2013). Jeho deficiencie snižuje odstraňování buněk amyloidu mikroglielemi až o 60 % a zvyšuje kumulaci plaků (Cornejo et al., 2018) a naopak jeho zvýšená regulace (upregulace) vede k nižší amyloidové zátěži u myších modelů (Frenkel et al, 2013).

Další mikroglální receptor SR-B2, také nazývaný CD36, tvoří komplex s TLR-4 a TLR-6, což vede k aktivaci cytokinů, chemokinů, produkci ROS, a také migraci mikroglíí, tvorbě inflamazomu a v konečném důsledku k neurotoxicitě (Coraci et al., 2002).

Vazba amyloidu β na mikroglální receptor SR-J1, nazývaný také RAGE, aktivuje mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) and NF- κ B a přispívá k dysfunkci synapsí prostřednictvím IL-1 β uvolňovaným u 2-3 měsíčních myší. Šestiměsíční myši s potlačenou expresí RAGE, měly menší amyloidní depozity a více degradujících enzymů (Vodopivec et al, 2009). Ale u 12měsíčních myší nebyla pozorována žádná změna kognitivních funkcí nebo mikroglální aktivace na plaky, z čehož lze usuzovat na to, že RAGE není zásadní pro aktivaci mikroglíí, ale může tvorbu plaků v začátcích onemocnění ovlivnit (Vodopivec et al, 2009).

3.2.2 Monocyty

Periferní monocyty pocházejí z hematopoetických kmenových buněk a jsou rozdělovány na dva typy; intermediární monocyty s vysokou expresí molekuly CD14⁺⁺ a nízkou expresí CD16⁺ molekuly; a neklasické monocyty, které molekulu CD14⁺ exprimují méně a CD16⁺⁺ více (Auffray et al., 2009). Klasické monocyty mají vliv na fagocytózu, imunitní odpověď a diferenciaci; neklasické více spolupracují se složkami komplementu, účastní se adheze a fagocytózy prostředkovanou Fc fragmenty; intermediární monocyty prezentují antigen a uvolňují cytokiny (Gren et al., 2015). Podle studie Thomea se hladina klasických monocytů v průběhu AN drasticky snižuje, zatímco zastoupení neklasických a intermediárních monocytů roste se zvyšující se amyloidovou zátěží (Thome et al., 2018). Navíc, hladiny C-reaktivního proteinu a složek komplementového systému C1s a C8a

uvolňované z monocytů se snižují v preklinické fázi AD, ale rapidně stoupají u pozdějších fází AN (Saresella et al., 2013, Thome et al., 2018).

CC-chemokine ligand 2 (CCL2, MCP-1), produkovaný astrocyty a mikroglieami stimulovanými amyloidem zprostředkovávají průnik monocytů do CNS navázáním na C-C motif chemokine receptor (CCR2) exprimovaným na monocytech (Kiyota et al., 2013). Vstupem monocytů se může efektivně regulovat zánět v mozku a ochránit neuronové synapse před toxickým efektem oligomerů amyloidu β (Li et al., 2020a). Receptory na monocytech související s internalizací amyloidu β jako jsou TLR2, CD33, TREM2 a další, jsou u pacientů s AN také sníženy (Chen et al., 2020). Výsledkem je, že kapacita monocytů vychytávat a degradovat amyloid je ohrožena, což přispívá ke zvyšování hladiny amyloidu. Cirkulující monocyty se také mohou diferencovat v makrofágy odvozené od monocytů a poměr těchto buněk je u myších AN modelů výrazně zvýšena (Martin et al., 2017).

3.2.3 Neutrofilů

Neutrofilů jsou nejhojnější periferní imunitní buňky, které se podílejí na obnovování homeostázi pohlcováním patogenů a produkcí cytokinů (Stock et al., 2018). Počet neutrofilů výrazně roste u pacientů s Alzheimerovou chorobou a vrchol jejich hladiny nastává, když se u pacientů objeví ztráta paměti (Wu et al., 2020). Neutrofilů na svém povrchu exprimují integrin *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1), který jim umožňuje infiltrovat se do mozku a zachycovat se na povrchích cév (Zenaro et al., 2015). Když jsou tyto neutrofilů vystaveny rozpustnému oligomernímu amyloidu β , mohou interagovat s intracelulární adhezivní molekulou 1 (*intercellular adhesion molecule-1 ICAM-1*) na cévách prostřednictvím LFA-1 integrinu a rychle se zachytit na stěnách cév a blokovat tak proudění krve, což vede k produkci amyloidu β , hyperfosforylaci tau proteinu a neurodegeneraci (Wu et al., 2020).

Naopak, deplece neutrofilů zlepšuje průtok krve mozkiem a zmírňuje neuropatologii související s AN u myších modelů s AN (Cruz Hernandez et al., 2019). Infiltrující neutrofilů také stimulují produkci zánětlivých cytokinů, jako je makrofágový zánětlivý protein (MIF) a IL-2, a tvorbu neutrofilních extracelulárních sítí (NETosis), což podporuje mikrogliaální aktivaci a neurozánět u AN (Park et al., 2019). Na druhé straně, aktivované

mikroglie také podporují průnik neutrofilů do mozku prostřednictvím sekrece různých zánětlivých cytokinů (Park et al., 2019).

3.2.4 NK buňky

NK (*Natural killers*) buňky jsou subpopulací lymfoidních buněk vrozené imunity, které mají imunomodulační schopnosti díky uvolňování cytoplazmatických granulí a zánětlivých cytokinů, jako jsou granzymy, kathepsin interferon gamma (IFN- γ) a tumor necrosis factor α (TNF- α) (Hashemi and Malarkannan, 2020). Ve srovnání se zdravými jedinci se v průběhu rozvoje Alzheimerovy choroby nemění frekvence cirkulujících NK buněk, ale významně se mění jejich cytotoxická aktivita (Le Page et al., 2015). Exprese granzymu B a zánětlivých cytokinů na NK buňkách výrazně rostla u mírné kognitivní poruchy a mírnějších stádií Alzheimerovy choroby, ale jejich exprese v NK buňkách pacientů s těžkou formou choroby zůstává kontroverzní (Araga et al., 1991; Le Page et al., 2015; Solerte et al., 2000; Vida et al., 2017).

Některé studie tvrdí, že přítomnost NK buněk zhoršovala zánět a urychlovala kognitivní pokles, a že léčba pomocí anti-NK buněk tento zánět zmírňovala, ale neovlivňovala patologii amyloidu β (Zhang et al., 2020b). Nicméně, funkce NK buněk u rozvoje neurodegenerativních onemocnění stále nepříliš jasná a je zapotřebí provést více studií.

3.2.5 Komplementový systém

Systém komplementu je klíčovým hráčem vrozené části imunitního systému a sestává ze sítě rozpustných membránových a plazmatických proteinů, které spolupracují na rozpoznávání a opsonizaci patogenů (Dalakas et al., 2020). Části komplementu mohou být uvolňovány imunitními buňkami vrozené imunity i neimunitními buňkami a společně se tak podílejí na procesech remodelace tkáně, chemotaxi, opsonizaci a zánětlivé odpovědi (Hawksworth et al., 2017).

Existují studie, které na myších modelech prokázaly, že aktivované komplementové proteiny jsou „upregulované“ předtím, než dochází k rozsáhlé agregaci amyloidu a ukládají se zejména na mikroglia blízko amyloidních plaků nebo tau zámočků (Eikelenboom and

Stam, 1982; Xiong et al., 2019). Velké množství proteinů komplementu, včetně clusterinu, C1q, C3a/b, C4a and C5a, je v mozkomíšním moku a plazmě pacientů s AN také zvýšeno (Krance et al., 2019). Dráhy komplementu hrají kritickou roli u metabolismu amyloidu β a neurozánětu. Amyloid totiž může aktivovat komplementovou kaskádu a stimulovat tak expresi proteinů C1q, C3 a jejich receptorů C1R and C3R (Yin et al., 2019). Aktivovaný komplement je schopný vyvolat neurozánět a neurodegeneraci u transgenních myších modelů s AN (Wu et al., 2019). Uvádí se, že protein C1q, klíčový aktivátor komplementového systému, vytváří jádro pro agregaci amyloidu β (Webster et al., 1995). Apoenzym E může vytvářet komplexy s C1q a inhibovat tak zahájení klasické dráhy komplementu (Yin et al., 2019). Komplexy C1q a APOE jsou přítomny v amyloidových placích, v choroidálním plexu a aterosklerotických tepnách u pacientů s AN, a také korelují se zhoršováním kognitivním funkcí a aterosklerózou (Yin et al., 2019).

Komplementový protein clusterin je také považován za iniciátora „clearance“ amyloidu β a zabraňuje vytváření fibril v časných fázích AN, ale zhoršuje kumulaci amyloidu v pozdních fázích AN (Miners et al., 2017). Kromě toho, amyloid β a protein tau jsou schopny zahajovat proces synaptického „označení“ aktivací komplementových proteinů, což vede ke ztrátě synapsí a chronickým zánětlivým stavům v mozku. C1q and C3 jsou považovány za hlavní modulátory ztráty synapsí, oba totiž mohou označovat synapse a zprostředkovávat tak jejich odstraňování mikroglie díky interakcemi s receptory C3aR a C5aR (Hernandez et al., 2017).

Komplementový systém má taky vliv na aktivaci mikroglíí (Rasmussen et al., 2018a). C5a, a C3 aktivace komplementu má prozánětlivý účinek na mikroglie a další myeloidní buňky (Klos et al., 2013). Komplement má tedy komplexní roli u Alzheimerovy choroby, ovlivňuje kumulaci amyloidu a tvorbu plaků, neurozánět, gliální odpověď a ztrátu synapsí. Jestli je ale komplement důležitý v patogenezi Alzheimerovy choroby je nutné ověřit dalšími studii.

4 ADAPTIVNÍ IMUNITA

Ve srovnání s nespecifickými odpověďmi přirozené části imunity na neurodegenerativní onemocnění, je role adaptivní imunity stále nepříliš známa (Lindestam Arlehamn et al., 2019). Nedávné studie prokázaly, že aktivace adaptivní části imunitního systému formuje patologii Alzheimerovy choroby a zhoršuje zánětlivé reakce (Shi et al., 2021). Nejzkoumanější je role adaptivní imunity u Alzheimerovy choroby jakožto nejčastějšího neurodegenerativního onemocnění. Zde přinášíme přehled jednotlivých částí adaptivní imunity a jak se podílí na této neurodegeneraci.

4.1 T lymfocyty

Podíl periferních T lymfocytů výrazně roste předtím, než dojde k ukládání chybně složeného amyloidu β a tau proteinu u pacientů s AN (Saresella et al., 2011). Když je narušena hematoencefalická bariéra, periferní T buňky mohou vstupovat do CNS (Mrdjen et al., 2018) a cestují do míst, která jsou typicky spojována s AN neuropatologií, jako je hippocampus, corpus callosum a cortex (Ciccarelli et al., 2014). V nedávné studii se objevily důkazy, že frekvence parenchymálních T buněk v cingulárním svazku souvisí s kognitivními funkcemi u stárnoucího mozku (Batterman et al., 2021). Vstupující T buňky klonují samy sebe a hlídají mikroprostředí v mozkomíšních moku. Ale u pacientů s AN mají tyto klony tendenci stárnout a exprimovat ve zvýšené míře cytotoxické faktory, což přispívá k imunitní nerovnováze (St-Amour et al., 2019).

Amyloid β může být prezentován T buňkám prostřednictvím antigen prezentujících buněk (APC) a indukovat tak aktivaci amyloid β -specifických T buněk (Monsonogo et al., 2013), ale role tohoto typu buněk u AN zůstává kontroverzní. Některé studie naznačují, že T buňky indukované amyloidem β jsou schopny zmírňovat ukládání depozitů amyloidu, snižovat aktivaci mikroglíí, a dokonce zlepšovat prostorovou paměť snížením sekrece cytokinů IL-2, IL-4, TNF alfa a GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Cao et al., 2009), zatímco jiné studie uvádějí, že tyto T buňky zesilují progresi AN produkcí prozánětlivého cytokinu IFN gama (Browne et al., 2013). Tyto protichůdné výsledky lze přičíst existenci různých subpopulací T lymfocytů (McManus et al., 2015).

Th1 a Th17 buňky mohou zhoršovat neurodegeneraci produkcí prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6, IL-17, IFN- γ , TNF- α a dalších (Zhang et al., 2013a). Th2 buňky mohou zprostředkovávat vytváření autoprotilátek proti amyloidu β (Haddad-Tovoli et al., 2017). Treg buňky podporují fagocytózu amyloidu mikroglie a makrofágy a zmírňují úpadek kognitivních funkcí, takže v časných stádiích onemocnění mají příznivý vliv (Dansokho et al., 2016). Nicméně, Treg lymfocyty brání „náboru“ leukocytů v pozdních fázích onemocnění, což vede ke zvýšené kumulaci amyloidu a zhoršení kognitivních funkcí pacientů (Baruch et al., 2015).

Vstupování T buněk do mozku je pozorováno také u tautopatií (Laurent et al., 2017). U AN myši bylo pozorováno, že frekvence T buněk v mozku, zejména CD8 T lymfocytů, pozitivně koreluje s patologií tau (Merlini et al., 2018). Navíc bylo zjištěno, že hladina Treg buněk souvisí s hladinou fosforylovaného tau. Tato zjištění vedou výzkumníky k názoru, že T buňky by mohly být slibným potenciálním biomarkerem pro diagnostiku neurodegenerací zprostředkovanou tau proteinem (Oberstein et al., 2018). Ale na druhé straně může tau protein podporovat „nábor“ T buněk do hippocampu a tím zhoršovat neurodegeneraci a zánět, jak je možné také vidět na obrázku 4 (Laurent et al., 2016, obr. 4). Dále se uvádí, že zvýšená hladina CD8 T buněk koreluje s Braakovými stadii Alzheimerovy choroby (Unger a kol., 2020).

Gate a kol. nedávno potvrdili, že zvýšený počet CD8⁺ T efektorových paměťových buněk CD45RA⁺ (TEMRA) byl na periférii a v mozkomíšním moku pacientů s AN (Gate et al., 2020). Buňky TEMRA se nacházejí v blízkosti amyloidních plaků v mozcích AD pacientů a mohou způsobovat neuronální dysfunkci uvolňováním několika zánětlivých a cytotoxických faktorů, jako je IFN- γ a granzym (Gate et al., 2020). Je zajímavé, že zvýšená hladina TEMRA buněk je také pozorována v mozkomíšním moku pacientů s Parkinsonovou chorobou, což naznačuje možnost, že neurodegenerativní onemocnění mohou mít podobné molekulární základy (Williams-Gray et al., 2018). Doposud je podrobný mechanismus toho, jak T buňky regulují neuronální okolí a patologii AN, stále nejasný a je zapotřebí dalšího výzkumu, stejně jako u ostatních imunitních buněk.

4.2 B lymfocyty

B buňky jsou dalšími důležitými imunitními buňkami adaptivní imunity. B buňky nejen, že uvolňují imunoglobuliny k modulaci humorální imunity (Seifert a Küppers, 2016), ale také se podílejí na prezentaci antigenů T buňkám a spouštějí imunitní reakce zprostředkované T buňkami (Martin et al., 2001). V séru pacientů s AN je frekvence B lymfocytů produkujících IgG zvýšená, ale celkový počet B lymfocytů klesá (Bulati et al., 2015; Sabatino et al., 2019). U pacientů s AN B buňky hojně exprimují množství proteinů souvisejících s neurodegenerativními změnami (Nataf et al., 2019). Některé prozánětlivé receptory B buněk, jako jsou CCR6 a CCR7, jsou u pacientů se středně těžkou a těžkou formou AN „upregulovány“ (Bulati et al., 2015). Amyloid β může indukovat vznik autoprotilátek proti amyloidu, což snižuje toxicitu oligomerů amyloidu a protofibril a výrazně zlepšuje prostorovou paměť u AN transgenních myších modelů (Dodel et al., 2011).

V další studii na myších se tvrdí, že intracerebrální podávání protilátek proti amyloidu nebo pre-imunizovaného myšího IgG může snižovat počet amyloidních plaků podporováním mikrogliální fagocytické aktivity (Marsh et al., 2016). Specifické protilátky proti tau proteinu byly nalezeny v mozcích a sérech pacientů s AN, ale B buňky tau patologii neovlivňují (van der Hoven et al., 2020). Ale jako u ostatních imunitních buněk je zapotřebí více studií pro plné pochopení role B lymfocytů v patologii neurodegenerativních onemocnění.

4.3 Autoprotilátky

Protilátky jsou nedílnou součástí adaptivního imunitního systému. IgM přirozené autoprotilátky (*IgM natural autoantibodies*, *IgM-NAAs*) jsou třída primárně polyreaktivních imunoglobulinů, které vykazují nízkou afinitu ale širokou specifitu k vlastním i cizím antigenům. Jsou fyziologicky produkovány za účelem fagocytózy apoptických buněk (Fereidan-Esfahani et al., 2019). V případě zánětu a infekcí dochází k uvolňování a afinitnímu vyzrávání protilátek třídy IgG, které reagují s vlastními antigeny. Na ně se vážou s vysokou afinitou, a tak dochází k dalšímu zánětlivému procesu, což může vyvolat autoimunitní onemocnění. Jak už bylo zmíněno, neurodegenerativní choroby mohou být typem autoimunitního onemocnění, protože u pacientů byly nalezeny hodnoty specifických autoprotilátek proti vlastním proteinům. Podle dostupné literatury se

zdá, že některé z protilátek se mohou podílet na patologii neurodegenerací, a naopak jiné mohou jejich průběh zmírňovat, především v raných fázích chorob (Wu & Li, 2016).

5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- Vypracovat podle zadaného tématu literární přehled, ve kterém budou zhodnoceny poznatky publikované v odborné literatuře
- Připravit vybrané antigeny a na nich testovat pomocí ELISA metod přítomnost autoantilátěk v séru osob s diagnostikovanými neurodegenerativními chorobami (Alzheimerova choroba, Parkinsonova demence, frontotemporální lobární degenerace, vaskulární demence)
- Navrhnout panel potenciálních biomarkerů vhodných pro diferenciální diagnostiku vybraných neurodegenerativních chorob

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Chemikálie:

- Koutovací vazebný roztok – BIC 10x, LOT 031119 (Sigma-Aldrich, USA)
- PBS (Phosphate buffered Saline) - kat. č. BE 17-517Q (Lonza, Švýcarsko)
- detergent Tween 20- kat. č. P1379, (Sigma-Aldrich, USA)
- Promývací roztok PBST (PBS s Tweenem), připraven v laboratoři
- BSA – Bovine serum Albumin - kat. č. 10735086001 (Sigma-Aldrich, USA)
- Diluent primární protilátky – Vidia DIL LOT 161119 (Vidia, Česká republika)
- Blokovací roztok (1 % BSA v PBST), připraven v laboratoři
- Diluent sekundární protilátky Seramun – DIL CONJ LOT 078-06-19 (Vidia, Česká republika)
- 1M H₂SO₄ – (M_R = 98,079 g/mol, Sigma-Aldrich, USA)
- TMB (3,3',5,5'- tetramethylbenzidine) - kat. č. R.CN75.2 (Carl Roth, Německo)

Biomolekuly:

- Protein Tau 441 – purifikace v laboratoři (Hromadkova, L. et al. 2015), 0,5 mg/ml
- GFAP - kat. č. ABIN368852, 0,5 mg/ml (Antibodies online, Německo)
- TDP – 43 –kat. č. ab41970, 1 mg/ml, (abcam, Velká Británie)
- NFL –kat. č. MBS2010106, 0,4 mg/ml (MyBioSource, USA)
- α – synuklein –kat. č. S7820, 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich, USA)
- TREM2 –kat. č. abx655342, 200 ug/ml (Abxexa, Velká Británie)
- MCP-1 –kat. č. abx068048, 200 ug/ml (Abxexa, Velká Británie)
- MBP –kat. č. ab4361, 1 mg/ml (abcam, Velká Británie)
- NSE – kat. č. RP-75668, 1 mg/ml (Thermo Fisher, Německo)
- FUS –kat.č. APREST86697, 1,7 mg/ml (Sigma-Aldrich, USA)
- Amyloid β – kat.č. ab120301, 0,5 mg/ml (abcam, Velká Británie)
- Neurogranin – kat.č. MBS1340607, 1 mg/ml (MyBioSource, USA)
- Chi3L1 –kat.č. CH1-H5228, 200 ug/ml (Acro Biosystems, USA)
- VSN-1 - kat.č. MBS286167, 1,8 mg/ml (MyBioSource, USA)

- Sekundární protilátka – NOVEX 1 mg Goat Anti-human IgG Fc antibody, HRP conjugate, highly cross-adsorbed, kat. č. 31413 (Thermo Fisher, Německo)
- vzorky sér pacientů s různými neurodegeneracemi dodané Motolskou nemocnicí

Materiál a laboratorní potřeby:

- 96 jamkové mikrotitrační destičky P Gama plate (GAMA, Česká republika)
- Pipety eppendorf 10 ul – 5000 ul (Merck, USA)
- Pipetovací špičky 1 ul – 5 ml (Omnitip, Švédsko)
- Mikrozkuhavky Eppendorf 1,5 – 2 ml (Merck, USA)
- Zkuhavky
- Kádinky
- Falconky 50 ml
- Skleněné zásobní lahve 1l

Přístroje:

- Třepačka titramax 100 (Heidolph, Německo)
- Automatická promývačka Wellwash 4MK2 (Thermo Fisher, Německo)
- Spektrofotometr TECAN spc infinite M200PRO (Tecan, Švýcarsko)
- Vortex (VELP Scientifica, Itálie)
- Váhy (KERN EG, USA)
- Lednice s mrazákem – 20 °C (Leibherr, Německo)
- Mrazicí box -80 °C Sanyo MDF-592 (Sanyo, Japonsko)

6.1 Metoda ELISA v sendvičovém uspořádání

6.1.1 Koutování desek

a) Příprava vazebného roztoku (BIC)

Vazebný roztok BIC 10x je dodáván společností Vidia s r.o., aby se minimalizovaly rozdílné podmínky experimentu. Je potřeba ho 10x naředit v deionizované vodě (900 ml BIC 10x a 100 ml dH₂O). Takto zředěný roztok bude použit jako ředící roztok pro antigeny, kterými bude potahovat mikrotitrační desky.

b) Naředění antigenu ve vazebném roztoku

V roztoku BIC naředíme antigen tak, aby koncentrace antigenu v BIC byla 0,5 ug/ml. Koncentrace antigenu byla vybrána empiricky na základě dřívějších optimalizací koncentrací a antigenů. Každý zásobní protein má jinou koncentraci, je tedy nutné přepočítat objem zásobního proteinu, který je potřeba k nakoutování desek. Jako příklad uvedeme ředění antigenu α -synuclein:

Koncentrace zásobního proteinu: 0,5 mg/ml

Koncentrace výsledná: 0,5 ug/ ml antigenu

Objem 4 800 ul na 100 jamek po 50 ul (počítáme 5 000 ul)

$5\ 000\ \text{ul} \times 0,5\ \text{ug/ml} = 2,5\ \text{ml}$ roztoku antigenu na jednu desku

$2,5\ \text{ml} / 0,5 = 5\ \text{ul}$ zásobního antigenu α -synuclein do 2,5 ml BIC 1x

Tímto způsobem vypočítáme všechny objemy antigenů, které budeme ředit a připravíme jejich roztoky. Každým roztokem antigenu potáhneme jednu desku se stripy, kterou po koutování rozebereme a poskládáme tak, abychom dostali desky se všemi antigeny v duplikátu:

1. Deska:

Tabulka 2: Nakoutovaná deska s první skupinou antigenů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	TREM2		MCP-1		α -synuclein		NfL		MBP		Nepotažené zablokované jamky	
E												
F												
G												
H												

2. Deska

Tabulka 3: Nakoutovaná deska s druhou skupinou antigenů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	NSE		TDP-43		FUS		amyloid β		neurogranin		Nepotažené zablokované jamky	
E												
F												
G												
H												

3. Deska

Tabulka 4: Nakoutovaná deska s třetí skupinou antigenů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D	Chi311		GFAP		Tau		VSN-1		Nepotažené zablokované jamky		Nepotažené zablokované jamky	
E												
F												
G												
H												

Takto antigeny potažené desky jsou hodinu nechány při laboratorní teplotě na stole, a poté přes noc inkubovány v lednici (celkově inkubace 20 - 24hod).

c) Příprava PBST

Připravíme 1 litr promývacího roztoku, což je 10 % roztok PBS s přidavkem detergentu Tween. Odměříme 100 ml PBS do 1 l láhve, doplníme do 1 l destilovanou vodou a přidáme 200 ul detergentu Tween.

d) Příprava 1 % BSA v PBST a blokace jamek

Pro blokaci desek používáme 1 % BSA v PBST. Máme 14 antigenů, potahujeme a blokuje tedy 14 desek, a proto potřebujeme asi 300 ml blokačního roztoku. Do každé jamky napipetujeme 200 ul blokačního roztoku a takto zablockované desky necháme přes noc v lednici a druhý den můžeme použít, případně zamrazit do -80°C.

e) Vysušení a uchování desek

Po zablockování jsou jamky promyty nejprve 3x promývacím roztokem PBST. Následně jsou desky vysušeny v inkubátoru 3 hodiny při 37 °C. Pokud desky hned nepotřebujeme, můžeme je vakuově zabalit a uchovávat v mrazáku při -80°C.

6.1.2 Vlastní provedení metody ELISA sendvičovou metodou

a) Inkubace primární protilátky

Koncentrace primární protilátky, v našem případě lidské sérum, byla stanovena z předchozích experimentů, kdy jsme optimalizovali její množství. Se společností Vidia s.r.o. jsme se shodli na optimální koncentraci 1:101. Sérum ředíme v ředícím roztoku, které opět poskytla Vidia s.r.o. Použijeme tři desky, abychom analyzovali všechny antigeny najednou. Potřebujeme přibližně 4 ml pufry, do kterého napipetujeme 40 ul séra. Deska s primární protilátkou bude vypadat takto:

Tabulka 5: Příklad testovací mikrotitrační desky č. 3 se vzorky. Vždy bylo použito kontrolní sérum a standardní vzorek. Vysvětlení těchto pojmů je v textu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kontrolní sérum												
Vz. 1												
Vz. 2												
Vz. 3	Chi311		GFAP		Tau		VSN-1		Nepotažené zablockované jamky		Nepotažené zablockované jamky	
Vz. 4												
Vz. 5												
Vz. 6												
standard												

Kontrolní sérum je sérum pacienta bez neurodegenerace a používáme ho pro porovnání signálů s dalšími deskami. Standard je vzorek, který byl získán zpoolováním mnoha sér pacientů bez diagnózy neurodegenerace. Protože je ze sér mnoha lidí, dá se předpokládat, že obsahuje široké spektrum autoprotilátek. Cílem použití tohoto vzorku bylo, že se použije pro každou desku; protože výsledek by měl být vždy stejný, měl by se dát použít pro „normalizaci“.

Do jamek pipetujeme 100 ul zředěného vzorku a necháme 60 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Poté 4x promyjeme 200 µl PBST roztoku. Jako standard (kontrolní vzorek) používáme sérum pacienta bez neurodegenerativního onemocnění a jako slepy vzorek ředící roztok primární protilátky. Ten pipetujeme pouze do třetí desky do posledních dvou sloupců nepotažených jamek.

b) Inkubace sekundární protilátky

Jako sekundární protilátku používáme konjugát kozí protilátky proti lidskému Fc fragmentu IgG s křenovou peroxidázou v glycerolovém stocku 1:1. Koncentrace doporučená výrobcem a námi ověřená optimalizací je 1: 15 000 v ředícím roztoku pro sekundární protilátku od Vidia s.r.o. Do každé jamky pipetujeme 100 ul zředěného konjugátu. Budeme inkubujeme 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté 4x promyjeme v promývačce 200 ul TBST a vyklepneme všechnu tekutinu z jamek.

c) Přidání substrátu

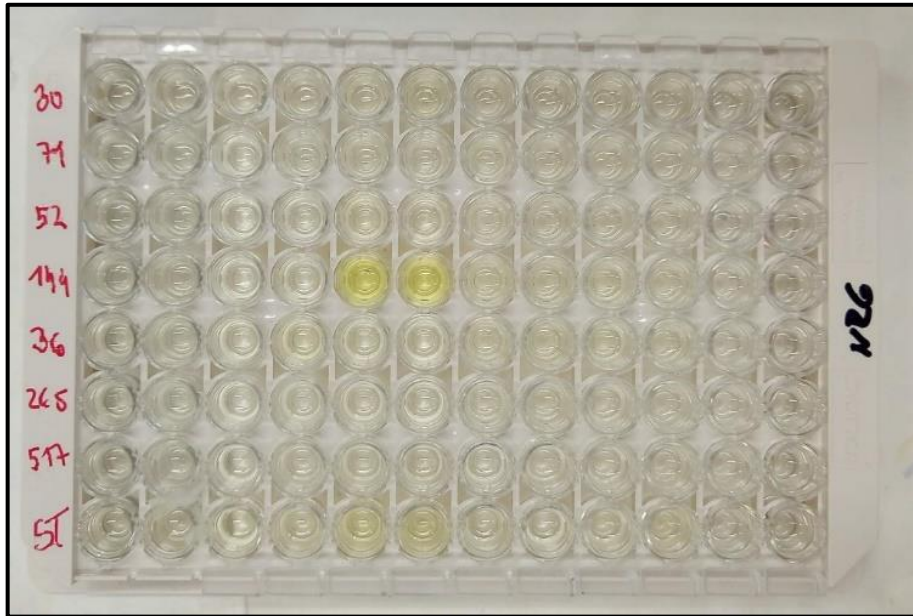
Dalším krokem je reakce enzymu a substrátu, díky které dojde k tvorbě barevného produktu, jehož absorbanci můžeme měřit spektrofotometricky. Do každé jamky přidáme 100 µl roztoku TMB, dodržujeme čas pipetování tak, aby v každé jamce byl roztok přesně stejnou dobu. Desku přikryjeme tak a chráníme před světlem a přesně 15 minut inkubujeme při laboratorní teplotě na třepačce.

d) Zastavení reakce

Reakci zastavíme přesně po uplynutí 15 minut přidáním 100 µl 1M H₂SO₄ do každé jamky bez předchozího promytí. Snažíme se dodržovat stejnou rychlost a pořadí jako při pipetování TMB, aby v každé jamce probíhala reakce stejně dlouho. V jamkách proběhla enzymatická reakce a přidáním kyseliny sírové se roztok změnil z modré na žlutou v případě pozitivní reakce, jak je vidět na obrázku č. 8.

e) Vyhodnocení výsledků

Desky vložíme do spektrofotometru a odečítáme absorbance při 450 nm. Absorbance vyhodnotíme statisticky a výsledky budou uvedeny v kapitole 7 Výsledky.



Obr. č. 5: Mikrotitrační deska se zastavenou enzymatickou reakcí pro ilustraci. Vlevo je interní označení vzorků, vpravo typ antigenu, pro který byla tato deska připravena. Takto připravené desky se vkládají do spektrofotometru a měří se absorbance při 450 nm. Vlastní foto

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Vzorky jsme analyzovali metodou heterogenní sendvičové ELISA metody (*The enzyme-linked immunosorbent assay*). Je to jednoduchá, rychlá a relativně levná technika, která se využívá pro detekci protilátek a antigenů. Ty jsou u heterogenní ELISA navázány na povrch mikrotitrační desky (Aydin, 2015).

Metoda je založena na vysoce specifické reakci antigenů a protilátek. Vzorek potenciálně obsahující analyzovaný antigen se pipetuje do 96 jamkové mikrotitrační desky a antigen se naváže na její povrch. Poté je nutné přidat blokovací roztok správné koncentrace, aby se co nejvíce zamezilo nespecifické vazbě protilátky na stěnu jamky. Deska se promyje a odstraní se nenavázané antigeny. Následuje inkubace primární protilátky o koncentraci, která se určí optimalizací, takzvanou titrací protilátky. V tuto chvíli dochází k imunologické reakci antigen – protilátka, jak je znázorněno na obrázku č. 7. Deska se opět promyje a odstraní se tak nadbytek primární protilátky. Dalším krokem je inkubace sekundární protilátky, která je značená enzymem, nejčastěji křenuvou peroxidázou. Sekundární protilátka, konjugát s enzymem, se váže na vazebná místa primární protilátky. Po přidání substrátu dochází k enzymatické reakci enzymu a substrátu, kdy peroxidáza katalyzuje přenos elektronů z peroxidu vodíku na akceptor, tedy substrát, a oxidací vzniká barevný produkt. Jeho intenzitu měříme spektrofotometricky při 450 nm (Beranová & Tonar, 2012.).

Výsledky jsou uvedeny na následujících stranách. Testovali jsme 30 vzorků pozitivních na Alzheimerovu chorobu, 14 vzorků s frontotemporální lobární degenerací, 9 vzorků s Parkinsonovou chorobou, 10 vzorků s vaskulární demencí a používali jsme 9 různých negativních kontrol, tedy vzorků bez neurodegenerativní choroby a všech 72 vzorků jsme testovali na přítomnost autoprottilátek proti 14 antigenům.

Výsledné absorbance ze spektrofotometru byly odečteny při vlnové délce 450 nm, byla odečtena interferující hodnota při vlnové délce 620-690 nm (referenční filtr spektrofotometru). Od naměřených absorbancí vzorků jsme odečetli pozadí (hodnoty nepotažených jamek) a výsledky jsme normalizovali podle kontrolního séra. Vzhledem k tomu, že charakter pokusu, který jsme dělali, nemá u většiny antigenů zatím žádné publikované numerické výsledky, podle kterých bychom mohli určit, který vzorek je stoprocentně pozitivní nebo negativní na přítomnost autoprottilátek, zvolili jsme hodnoty

pozitivity a negativity empiricky a vzhledem ke standardům a slepému vzorku a to tak, že jsme klasifikovali hodnoty titrů protilátek do pěti skupin:

- „0“ (na úrovni slepého vzorku);
- „0+“ (vyšší než slepý vzorek o 0,05 OD, ale nejednoznačně – třeba proto, že duplikáty slepého vzorku se značně lišily)
- pro pozitivní vzorky „+“ (vyšší o 0,1 – 0,2 OD)
- „++“ (vyšší o 0,2 – 1,0 OD)
- „+++“ (vyšší než 1,5 OD)

Výslednou tabulku, která je součástí kapitoly Přílohy, jsme poskytli nezávislému statistikovi RNDr. Janu Klaschkovi, Ph.D. z Ústavu informatiky Akademie věd ČR, který výsledky společně se svým týmem statisticky zpracoval. Získali jsme statistický model četností výsledků, které jsou „pozitivní“ u jednotlivých antigenů a neurodegenerací. Výsledkem jsou tabulky četností, znázorňující počet „nejvíce pozitivních“ výsledků u jednotlivých vzorků, antigenů a skupin onemocnění.

V tabulce také vidíme tučně zvýrazněnou hodnotu mediánu, tedy úroveň protilátek, která dělí data ve skupině na 50 % menších a 50 % větších hodnot. Medián je vhodným ukazatelem polohy dat v situaci, kdy data nejsou číselná, ale hodnoty jsou uspořádané, tedy jako v našem případě, a proto jsme zvolili tuto funkci. Podle mediánu tedy usuzujeme na pozitivitu výsledků a z nich jsme vytvořili potenciální panel antigenů pro průkaz autoprotilátek u neurodegenerativních chorob.

7.1 Výsledky stanovení protilátek metodou ELISA

7.1.1 Výsledky stanovení protilátek proti TREM2

Výsledky antigenu TREM2 vidíme v tabulce č. 1. Absolutní četnosti vyjadřují četnost a „míru positivity“ přítomnosti autoprotilátek proti jednotlivým antigenům u různých typů neurodegenerací. Řádkově relativní četnosti jsou vyjádřené v procentech v rámci jedné diagnózy.

Výsledky odečítáme z tabulek *Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti* pro jednotlivé antigeny. Že v jedné skupině je protilátek (empiricky) jednoznačně více než ve druhé, poznáme tak, že v řádku odpovídajícím jedné skupině, jsou čísla v každém sloupci

aspoň tak velká, jako na řádku odpovídajícím druhé skupině. Například ve skupině VD v tabulce č. 2 Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti pro TREM2 je v tomto smyslu víc protilátek než ve skupině PD, protože $100 \geq 100$, $80 \geq 66,7$, $80 \geq 44,4$, $10 \geq 0$ a $0 \geq 0$. Často se stane, že žádná ze dvou skupin není v uvedeném smyslu „lepší“ než druhá, například zde u skupin AN a FTD, kde je $83,3 < 85,7$, ale $73,3 > 71,4$.

Dále jsou v tabulkách *Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti* tučně zvýrazněna čísla ve sloupci, kde se nachází medián skupiny (a celého souboru v posledním řádku). Z hodnoty mediánu jsme u každého antigenu určili jeho specifitu pro danou neurodegeneraci. Tedy, jak moc „pozitivní“ byla hodnota protilátek proti danému antigenu u jednotlivých chorob. Porovnávali se skupiny „0“ a „0+“ s „+“, „++“ a „+++“.

Tímto způsobem jsme vyhodnotili všechny skupiny chorob a antigenů a výsledkem je potenciální panel antigenů vhodný pro diagnostiku jednotlivých neurodegenerací, který bude uveden v kapitole 11 Závěr. Všechny tabulky budou uvedeny v přílohách v kapitole 13 Přílohy, zde uvádíme pouze tabulky *Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti* a pro antigen TREM2 také tabulku absolutních a řádkově relativních četností pro ilustraci.

V tabulce č. 1 tedy vidíme, že 18 vzorků sér bylo pozitivních („+“) na přítomnost autoprotiátek proti TREM2. Procentuálně je to 60 % z celkového počtu 30 vzorků pozitivních na AN. Další 4 byly dokonce „více pozitivní“ („++“). Celkem se tedy jedná o 22 pozitivních vzorků z 30, ostatní byly víceméně negativní čili u nich nebyly detekovány protilátky proti antigenu TREM2.

Tabulka 6: Absolutní a řádkově relativní četnosti v procentech pro TREM2

	Absolutní četnosti						Řádkově relativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++	Celkem	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	5	3	18	4	0	30	16,7	10	60	13,3	0	100
FTD	2	2	8	2	0	14	14,3	14,3	57,1	14,3	0	100
PD	3	2	4	0	0	9	33,3	22,2	44,4	0	0	100
VD	2	0	7	1	0	10	20	0	70	10	0	100
kontrola	0	0	7	2	0	9	0	0	77,8	22,2	0	100
Celkem	12	7	44	9	0	72	16,7	9,7	61,1	2,5	0	100

V tabulce č. 2 vidíme tučně zvýrazněny hodnoty mediánů pro skupiny nemocí. Podle výše uvedeného způsobu vyhodnocení jsme určili, že TREM2 je více specifický pro vaskulární demenci než pro Parkinsonovu chorobu (80,0>66,7), ale protože mezi skupinami AN a FTD není významný rozdíl (71,4<73,3), nepovažujeme TREM2 za antigen, který by mohl specificky odhalit Alzheimerovu chorobu od frontotemporální lobární degenerace. Zdá se tedy, že pro vaskulární chorobu by mohl být TREM2 jeden z antigenů, který by se mohl podílet na specifické diagnostice této choroby.

Tabulka 7: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti pro TREM2

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	83,3	73,3	13,3	0
FTD	100	85,7	71,4	14,3	0
PD	100	66,7	44,4	0	0
VD	100	80	80,0	10	0
kontrola	100	100	100	22,2	0
Celkem	100	83,3	73,6	12,5	0

7.1.2 Výsledky stanovení protilátek proti MCP-1

U antigenu MCP-1 jsme vyhodnotili výsledky stejně, jako u předchozího antigenu. Uvádíme pouze tabulku *Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti*, tabulka absolutních četností je součástí příloh v kapitole 10 Přílohy.

Z těchto výsledků usuzujeme na to, že MCP-1 je nejvíce specifický pro onemocnění Parkinsonovy demence, respektive pro její vyloučení. Jinak řečeno, pozitivní protilátky proti MCP-1 vylučují onemocnění Parkinsonovou chorobou, protože medián se nachází u skupiny „0“. Pro odlišení ostatních chorob jsou hodnoty příliš podobné. Kromě toho, ve skupině FTD dochází k tomu, že medián je nejednoznačný, definici splňuje jak kategorie

„0+“, tak kategorie „+“. Je to důsledek toho, že přesně 50 % pacientů má výsledky ve skupinách „0“ nebo „0+“ a přesně 50 % má hodnoty v kategorii „+“, „++“ nebo „+++“.

Tabulka 8: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro MCP-1

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	60	60	23,3	3,3
FTD	100	57,1	50	14,3	0
PD	100	44,4	33,3	11,1	0
VD	100	60	60	20	10
kontrola	100	44,4	22,2	0	0
Celkem	100	55,6	50	16,7	2,8

7.1.3 Výsledky stanovení protilátek proti α – synucleinu

Z následující tabulky č. 4 je patrné, že hodnoty všech mediánů pro α -synuclein jsou podobné. Největší procento pozitivních vzorků se objevilo ve skupině FTD, ale hodnoty mediánů nejsou tak specifické, jak bychom u tohoto antigenu u FTD nebo PD čekali. Stále je ale α -synuclein více specifický pro tyto dvě choroby než pro AN.

Tabulka 9: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro α - synuclein

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	56,7	43,3	6,7	3,3
FTD	100	57,1	57,1	21,4	7,1
PD	100	55,6	55,6	0	0
VD	100	60	60	0	0

Kontrola	100	22,2	22,2	0	0
Celkem	100	52,8	57,2	6,9	1,4

7.1.4 Výsledky stanovení protilátek proti NFL

Nfl se zdá být slibným biomarkerem pro diagnostiku Alzheimerovy choroby a vaskulární demence, hodnoty mediánů ukazují, že by bylo možné odlišit tyto dvě choroby od zbývajících dvou, nikoliv ale jednu od druhé.

Tabulka 10: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro Nfl

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	93,3	90	33,3	10
FTD	100	92,9	78,6	42,9	0
PD	100	88,9	77,8	11,1	0
VD	100	100	90	30	10
Kontrola	100	88,9	77,8	44,4	11,1
Celkem	100	93,1	84,7	33,3	6,9

7.1.5 Výsledky stanovení protilátek proti MBP

Mediány pro MBP ukazují, že tento antigen je více specifický pro FTD, PD a VD než pro AN. Pro rozlišení těchto skupin neurodegenerací jsou hodnoty jejich mediánů ale příliš podobné.

Tabulka 11: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro MBP

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	50	46,7	13,3	0
FTD	100	71,4	64,3	14,3	0
PD	100	66,7	66,7	11,1	0
VD	100	80	70	30	10
kontrola	100	66,7	22,2	0	0
Celkem	100	62,5	52,8	13,9	0

7.1. 6 Výsledky stanovení protilátek proti NSE

NSE se zdá být podle výsledků jako slibný biomarker pro diagnostiku vaskulární demence, zdá se, že by mohl spolehlivě odlišit vaskulární demenci od ostatních onemocnění.

Tabulka 12: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro NSE

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	60	46,7	20	6,7
FTD	100	78,6	57,1	42,9	14,3
PD	100	66,7	44,4	22,2	0
VD	100	90	90	40	10
Kontrola	100	55,6	44,4	11,1	0
Celkem	100	68,1	54,2	26,4	6,9

7.1.7 Výsledky stanovení protilátek proti TDP-43

Z výsledků hodnot mediánů pro TDP-43 se jeví tento antigen jako spíše nespecifický. U většiny vzorků byly zjištěny hodnoty mediánů v příliš nízké skupině „0+“, než aby mohl tento antigen pomoci k diagnostice.

Tabulka 13: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro TDP-43

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	56,7	40	13,3	0
FTD	100	64,3	35,7	14,3	0
PD	100	44,4	44,4	0	0
VD	100	60	30	30	0
Kontrola	100	22,2	11,1	0	0
Celkem	100	52,8	34,7	12,5	0

7.1.8 Výsledky stanovení protilátek proti FUS

Nejvíce pozitivních vzorků na protilátky proti antigenu FUS jsme detekovali ve vzorcích sér s vaskulární demencí a zároveň je pro ni ze všech nemocí nejspecifičtější. Mezi potenciální biomarkery bychom tedy FUS zařadili pro VD.

Tabulka 14: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro FUS

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	63,3	53,3	26,7	3,3
FTD	100	57,1	50	21,4	21,4

PD	100	33,3	33,3	33,3	0
VD	100	80	80	20	0
Kontrola	100	44,4	33,3	11,1	0
Celkem	100	58,3	51,4	23,6	6,9

7.1.9 Výsledky stanovení protilátek proti amyloidu β

Výsledky pro amyloid β se nezdají být specifické ani pro jednu z chorob, mediány se naprosto shodují, navíc ve skupině „0“, mezi potenciálními biomarkery tedy amyloid β nezahrneme pro žádnou chorobu.

Tabulka 15: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro amyloid β

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	50	46,7	10	0
FTD	100	42,9	35,7	7,1	0
PD	100	44,4	33,3	0	0
VD	100	50	40	20	0
Kontrola	100	44,4	33,3	0	0
Celkem	100	47,2	40,3	8,3	0

7.1.10 Výsledky stanovení protilátek proti neurograninu

Neurogranin se podle výsledků zdá být více specifickým biomarkerem pro Alzheimerovu chorobu a frontotemporální lobární degeneraci než pro zbylá dvě onemocnění. Použití neurograninu jako biomarkeru pro rozlišení AN a FTD bychom vzhledem k minimálnímu rozdílu hodnot mediánů nedoporučili. Lze ho ale použít do potenciálního panelu biomarkerů pro choroby AN a FTD.

Tabulka 16: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro neurogranin

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	80	73,3	33,3	13,3
FTD	100	71,4	71,4	28,6	7,1
PD	100	77,8	55,6	33,3	33,3
VD	100	90	60	30	10
Kontrola	100	88,9	66,7	0	0
Celkem	100	80,6	68,1	27,8	12,5

7.1.11 Výsledky stanovení protilátek proti Chi3L1

Chi3L1 se jeví jako slibný biomarker pro diagnostiku vaskulární demence, částečně také pro PD, zařadíme ho tedy do panelu biomarkerů pro tyto dvě choroby.

Tabulka 17: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro Chi3Li

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	50	40	3,3	0
FTD	100	50	35,7	0	0
PD	100	66,7	66,7	0	0
VD	100	80	80	10	0
kontrola	100	22,2	11,1	0	0
Celkem	100	52,8	44,4	2,8	0

7.1.12 Výsledky stanovení protilátek proti GFAP

U GFAP je hodnota mediánu nejvyšší u vaskulární demence a částečně u vzorků s Parkinsonovou chorobou.

Tabulka 18: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro GFAP

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	43,3	43,3	23,3	13,3
FTD	100	50,0	28,6	14,3	0
PD	100	66,7	55,6	22,2	22,2
VD	100	70	60	20	10
Kontrola	100	22,2	11,1	0	0
Celkem	100	48,6	40,3	18,1	9,7

7.1.13 Výsledky stanovení protilátek proti Tau 441

Z našich výsledků se zdá, že tau protein je sice pozitivní u všech vzorků s neurodegeneracemi, ale specifický není pro žádnou z nich. Přesto, že se tau používá v běžné diagnostice pacientů s těmito typy chorob, podle našich výsledků by v potenciálním panelu biomarkerů mohl sloužit pouze pro potvrzení neurodegenerativního onemocnění.

Tabulka 19: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro tau 441

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	93,3	86,7	36,7	6,7
FTD	100	71,4	71,4	14,3	7,1

PD	100	77,8	77,8	22,2	0
VD	100	80	80	40	0
Kontrola	100	66,7	66,7	11,1	0
Celkem	100	81,9	79,2	27,8	4,2

7.1.14 Výsledky stanovení protilátek proti VSN-1

Z tabulky pro VSN-1 se zdá, že by to mohl být slibný antigen pro diagnostiku vaskulární demence. Pro Alzheimerovu chorobu a frontotemporální lobární degeneraci jsou hodnoty mediánů příliš podobné na to, aby bylo možné použít pro rozlišení těchto dvou chorob, nicméně medián pozitivních výsledků je u těchto chorob také významný.

Tabulka 20: Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %) pro VSN-1

Řádkově relativní reverzní kumulativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++
AN	100	60	53,3	26,7	0
FTD	100	64,3	57,1	14,3	0
PD	100	44,4	44,4	22,2	0
VD	100	90	80	30	0
Kontrola	100	22,2	11,1	11,1	0
Celkem	100	58,3	51,4	22,2	0

Pro určení, pro který antigen se tvoří nejvíce protilátek u určitého typu pacientů více než u jiného, jsme využili statistického vyhodnocení Mann-Whitneyova testu. Hodnoty našich absorbancí byly opět poskytnuly RNDr. Janu Klaschkovi, Ph.D. z Ústavu informatiky Akademie věd ČR, který nám je statisticky vyhodnotil. Výsledky jsou uvedeny níže v tabulce 16 a 17.

V tabulce jsou tzv. p-hodnoty Mann-Whitneyova testu, kterým se porovnává úroveň určitého typu protilátky ve dvou skupinách pacientů. Výsledek testu je tzv. statisticky významný, pokud pro p-hodnotu platí $p < 0,05$. Statisticky významné výsledky jsou v tabulce zvýrazněny žlutě. Ostatní výsledky testů jsou tzv. statisticky nevýznamné.

Tabulka 21: Výsledky Mann-Whitneyova testu, 1. část

	TREM2	MCP_1	Alfa_syn	Nfl	MBP	NSE	TDP_43
AD vs. FTD	1.0000	0.5451	0.4256	0.8804	0.2954	0.1762	0.8633
AD vs. PD	0.0849	0.2541	0.8992	0.1425	0.4568	0.9169	0.6043
AD vs. VD	0.9424	0.9867	0.7087	0.9164	0.1054	0.0408	0.8308
AD vs. contr	0.1188	0.1015	0.1030	0.9423	0.7613	0.6999	0.0599
FTD vs. PD	0.1313	0.5190	0.5582	0.2627	0.9173	0.3165	0.5693
FTD vs. VD	0.9461	0.6611	0.6532	0.9498	0.4729	0.5669	1.0000
FTD vs. contr	0.1576	0.2774	0.0768	0.8418	0.1447	0.1640	0.0548
PD vs. VD	0.1413	0.3561	0.8488	0.2369	0.4564	0.0976	0.5421
PD vs. contr	0.0075	0.7692	0.1587	0.2960	0.2252	0.6776	0.2403
VD vs. contr	0.1863	0.1874	0.1050	0.9305	0.0626	0.0389	0.0902

Tabulka 22: Výsledky Mann-Whitneyova testu, 2. část

	FUS	Amylbeta	NGRN	Chi3Li	GFAP	Tau_441	VSNL1
AD vs. FTD	0.9162	0.5772	0.6534	0.8461	0.7714	0.0914	0.8524
AD vs. PD	0.4490	0.5192	0.9176	0.2938	0.3953	0.3005	0.5467
AD vs. VD	0.5129	0.9185	0.7461	0.0434	0.3989	0.7873	0.2259
AD vs. contr	0.2405	0.5192	0.2298	0.1111	0.1410	0.0646	0.0527
FTD vs. PD	0.4727	0.9154	0.8195	0.2479	0.2597	0.6728	0.6610
FTD vs. VD	0.4563	0.6286	0.9274	0.0420	0.2188	0.3100	0.1697
FTD vs. contr	0.3990	0.9154	0.4513	0.1686	0.1720	0.7501	0.0633
PD vs. VD	0.3402	0.5921	0.9666	0.3669	1.0000	0.5366	0.1562
PD vs. contr	0.9598	1.0000	0.7439	0.0348	0.0403	0.4909	0.2911
VD vs. contr	0.0970	0.5921	0.5706	0.0060	0.0257	0.2176	0.0067

Pokud pro dvě skupiny a jistý typ protilátky vyjde test statisticky významně, lze to brát jako potvrzení hypotézy, že při jedné z diagnóz se vytváří více protilátek než při druhé diagnóze.

Vyhodnocením těchto výsledků je tedy to, že pro rozlišení Alzheimerovy demence a vaskulární choroby se jeví jako slibným biomarker NSE a Chi3L1, protože statistický rozdíl mezi pozitivními a negativními výsledky byl u těchto antigenů u těchto chorob

nejvýznamnější. Zdá se, že Chi3L1 by dokonce mohla sloužit pro rozlišení chorob vaskulární demence a frontotemporální lobární degenerace.

U Parkinsonovy choroby bylo zjištěno, že pozitivních výsledků u antigenů TREM2, Chi3L1 a GFAP bylo statisticky významně více než u kontrolních vzorků. Z toho usuzujeme, že pomocí těchto antigenů by bylo možné odlišit zdravé (bez neurodegenerace) osoby od pacientů s Parkinsonovou chorobou.

U vaskulární demence bylo těchto výsledků dokonce ještě více, pozitivní vzorky významně se lišící od kontrolních jsme naměřili u antigenů NSE, Chi3L1, GFAP a VSN-1.

Pro skupinu vzorků s Alzheimerovou chorobou a frontotemporální lobární degenerací jsme nedetekovali protilátky proti žádnému z antigenů, který by se významně lišil od kontrolních vzorků. Paradoxně ani amyloid β a protein tau navzdory současnému rutinnímu používání v diagnostice, se nezdá být příliš specifický pro žádné z těchto onemocnění.

Nutno dodat, že statisticky nevýznamný výsledek není potvrzením, že při obou diagnózách se protilátek vytváří stejně – pouze musíme takovou možnost připustit. Dále je třeba počítat s určitým rizikem falešně pozitivního výsledku. Konkrétně existuje riziko 5 %, že i v případě, že při dvou diagnózách se tvoří stejně protilátek určitého typu, test vyjde statisticky významně, to znamená, že test je falešně pozitivní.

Výsledky absorbancí protilátek proti jednotlivým antigenům jsme diskutovali s publikovanými studiemi.

Přesto, že je **amyloid β** jeden z nejvyužívanějších biomarkerů pro diagnostiku Alzheimerovy choroby, nám se bohužel u našich vzorků nepovedlo potvrdit či vyvrátit, zda by byl amyloid β specifičtější pro jednu chorobu více než pro jinou. Na druhou stranu, Lövheim et al. také měřili rozdíly mezi koncentracemi amyloidu β v plazmě a séru pacientů s Alzheimerovou chorobou a zdravých lidí a významné rozdíly také nepozorovali (Lövheim et al., 2016).

Bartoš s kolektivem prokázal autoprottilátky proti **tau proteinu** a amyloidu β v krvi i v mozkomíšním moku (Bartos et al., 2012). My jsme je také detekovali v séru pacientů s Alzheimerovou chorobou, ale také u ostatních neurodegenerací. U FTD jsou séra

pacientů také pozitivní na přítomnost protilátek proti tau proteinu, ale jejich hladiny se liší ve srovnání s hodnotami v sérech pacientů s AN, navíc má FTD jiné specifické biomarkery (Maetzler et al., 2011).

Podle studie z roku 1995 vykazují autoprottilátky proti **GFAP** v séru vyšší hladiny u Alzheimerovy choroby než u kontrol a tyto hladiny ještě rostou u pacientů s vaskulární demencí (Mecocci et al., 1995). Novější studie jsou zaměřeny na měření autoprottilátek z mozkomíšního moku. My jsme tuto hypotézu nepotvrdili, naše vzorky nevykazovaly vyšší hodnotu u AN než u kontrol. Na druhou stranu, u pacientů s vaskulární demencí byly hodnoty také vyšší než u kontrolních vzorků a podle našich dat jsme usoudili, že GFAP je pro vaskulární chorobu jedním z vhodných biomarkerů.

Protilátky proti **TDP-43** jsme ve významném počtu neobjevili v žádném ze vzorků, které jsme testovali. TDP-43 je podle dostupné literatury specifickým biomarkerem pro diagnostiku amyotrofické laterální sklerózy (Suárez-Calvet et al., 2014), kterou jsme do této práce nezařadili.

Autoprottilátky proti **α -synukleinu** již byly ve studiích popsány, a to u pacientů s Parkinsonovou chorobou (Koehler et al., 2013, Smith et al., 2012). Podle našich výsledků je přítomnost autoprottilátek proti α -synukleinu specifická právě pro Parkinsonovu chorobu.

Protilátky proti **NfL** v séru, které u našich vzorků vyšly významně zvýšené u pacientů s AN, FTD a VD dosud nebyly popsány v dostupné literatuře. Současné výzkumy se soustředí na měření koncentrace samotného proteinu NfL nejčastěji v mozkomíšním moku. Samotný antigen je ale předmětem nejnovějších studií, protože jeho hodnoty v mozkomíšním moku prudce stoupají, a to u tautopatií, amyloidopatií i synuklenopatií (Bacioglu et al., 2016).

Bylo publikováno, že koncentrace **neurograninu** výrazně stoupá v mozkomíšním moku pacientů rychle po akumulaci amyloidu β a tedy že hladina neurograninu by mohla být vhodným biomarkerem pro sledování úbytku synapsí (Simrén et al., 2020). Ale autoprottilátky proti tomuto antigenu v séru u neurodegenerativních chorob ještě popsány

nebyly. Z našich výsledků ale vyplynulo, že i autoprotilátky proti neurograninu by mohly být vhodným biomarkerem, a to především u Alzheimerovy choroby a frontotemporální lobární demence.

Autoprotilátky proti antigenům **MBP** a **NSE** byly testovány v séru pacientů s Alzheimerovou chorobou a dalšími psychiatrickými onemocněními a autoři uvádějí, že nejvyšší počet pozitivních vzorků na přítomnost protilátek byla právě u AN ve srovnání s kontrolními vzorky a jinými psychiatrickými diagnózami, jako je například schizofrenie (Janković and Djordjijević, 1991). Podle našich výsledků jsou ale tyto dva antigeny specifitější spíše pro ostatní neurodegenerace, tedy PD, FTD a VD, než pro AN. Autoři výše uvedené studie ale srovnávali jiné typy chorob než my. Novějších studie zabývajících se protilátkami proti těmto antigenům u neurodegenerativních chorob jsme neobjevili.

Pro ostatní antigeny, **TREM2**, **Chi311**, **FUS**, **MCP-1** a **VSN-1** dosud nebyly popsány hodnoty autoprotilátek u neurodegenerativních chorob v séru, můžeme tedy pouze spekulovat, že vzhledem k výskytu samotných proteinů v krvi i mozkomíšním moku pacientů, budou autoprotilátky přítomny.

Naším úkolem bylo navrhnout panel potenciálních biomarkerů pro diagnostiku neurodegenerativních onemocnění měřením koncentrace autoprotilátek proti vybraným antigenům. Ze statistického vyhodnocení výsledných absorbancí navrhuje tyto biomarkery:

- Pro imunochemickou diagnostiku Alzheimerovy choroby prováděného ze séra pacienta navrhuje jako potenciální biomarkery koncentraci autoprotilátek proti proteinům **TREM2**, **MCP-1**, **NfL**, **FUS**, **NRG** a **tau 441**.
- Pro imunochemickou diagnostiku frontotemporální lobární degenerace prováděného ze séra pacienta navrhuje jako potenciální biomarkery koncentraci autoprotilátek proti proteinům **TREM2**, **alfa synuclein**, **NfL**, **MBP**, **NSE**, **NRG** a **tau 441**.

- Pro imunochemickou diagnostiku Parkinsonovy choroby prováděného ze séra pacienta navrhuje jako potenciální biomarkery koncentraci autoprotilátek proti proteinům **alfa synuclein, NfL, MBP, Chi3Li, GFAP a tau 441**.
- Pro imunochemickou diagnostiku vaskulární demence prováděného ze séra pacienta navrhuje jako potenciální biomarkery koncentraci autoprotilátek proti proteinům **TREM2, MCP-1, NfL, MBP, NSE, FUS, Chi3Li, GFAP, tau 441 a VSN-1**.

8 ZÁVĚR

V průběhu jednoho roku jsme s v laboratořích Národního ústavu duševního zdraví testovali vzorky sér, plazem a mozkomíšních moků pacientů s různými typy neurodegenerací za účelem zjistit, zda by některý z navržených antigenů nebo jejich kombinace mohla vést ke specifické diagnostice těchto chorob a případně je také rozlišit mezi sebou. Výsledkem by měl být panel potenciálních biomarkerů, které by měli být testovány na přítomnost autoprotilátek u pacientů, a to nejlépe z krve, tedy séra nebo plazmy.

Nutno podotknout, že naše měření provázela řada problémů. Ne vždy byly výsledky konzistentní, a to hlavně mezi duplikáty. Dalším problémem byla kolísavá úroveň signálu mezi jednotlivými měřeními, což jsme ale numericky kompenzovali kontrolním vzorkem, který jsme vždy používali. Také jsme se nějakou dobu potýkali s problémy se sekundární protilátkou, která způsobovala příliš vysoký signál a řada měření tak byla nepoužitelná. Kromě toho, do naší spolupráce zasáhla nepříznivá epidemiologická situace, takže nebylo provedeno takové množství měření, jaké by si tento výzkum zasloužil.

Na druhou stranu se nám za dobu spolupráce povedlo do jisté míry optimalizovat řadu parametrů, jako je například koncentrace primární i sekundární protilátky a jednotlivých antigenů. Také jsme navrhli potenciální panel antigenů, které by mohly sloužit pro diagnostiku jednotlivých neurodegenerativních onemocnění, což bylo účelem této práce. Zjistili jsme, že testování protilátek proti navrženým antigenům je slibná cesta pro budoucí výzkum, která si zaslouží další zkoumání.

9 LITERÁRNÍ ZDROJE

ANDERSSON, C., BLENNOW, K., ALMKVIST, O., et al. Increasing CSF phospho-tau levels during cognitive decline and progression to dementia. *Neurobiology of Aging*. 2008, **29** (10), 1466–1473. ISSN 01974580

ANDERSON, N. D. State of the science on mild cognitive impairment (MCI). *CNS Spectrum*. 2019, **24** (1), 78–87. ISSN 1092-8529

ARAGA, S., KAGIMOTO, H., FUNAMOTO, K., ET AL. Reduced natural killer cell activity in patients with dementia of the Alzheimer type. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1991, **84**, 259–263. ISSN 00016314, 16000404

AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015, **72**, 4–15, ISSN 01969781

AUFFRAY, C., SIEWEKE, M.H., GEISSMANN, F., Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*. 2009, **27**, 669–692 0732-0582, ISSN 1545-3278

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*. 2019, **287**, 70–74, ISSN 0925-4927.

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*. 2012, **252** (1), 100–105, ISSN 0165-5728, ISSN 1872-8421

BARUCH, K., ROSENZWEIG, N., KERTSER, A., ET AL. Breaking immune tolerance by targeting Foxp3+ regulatory T cells mitigates Alzheimer's disease pathology. *Nature Communications*, 2015, **6**, 7967. ISSN 2041-1723

BATTERMAN, K.V., CABRERA, P.E., MOORE, T.L., ET AL., 2021. T Cells Actively Infiltrate the White Matter of the Aging Monkey Brain in Relation to Increased Microglial Reactivity and Cognitive Decline. *Frontiers in Immunology*. **12**, 607691, ISSN 1664-3224

BERANOVÁ, M., TONAR, Z., Principy a příklady imunohistochemie. *Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni*. 2012, 32

BIANCONI, V., SAHEBKAR, A., ATKIN, S.L. The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Curr Opin Hematol*. 2018, **25** (1), 44-51, 28914666

- BIESSELS, G. J., 2016. Diagnosis and treatment of vascular damage in dementia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2016, **1862** (5), 869–877, ISSN 0925-4439
- BLENNOW, K., MATTSSON, N., SCHÖLL, et al. Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015, **36** (5), 297–309, ISSN 01656147
- BOGGS, J. M. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cellular Molecular Life Sciences*. 2016, **63** (17), 1945–1961, ISSN 1420-9071
- BROWN, G.C., VILALTA, A. How microglia kill neurons. *Brain Research*. 2015, **1628**, 288–297. ISSN 00068993
- BROWNE, T.C., MCQUILLAN, K., MCMANUS, R.M., et al. IFN- γ Production by Amyloid β -Specific Th1 Cells Promotes Microglial Activation and Increases Plaque Burden in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *The Journal of Immunology*. 2013, **190**, 2241–2251. 0022-1767. ISSN 1550-6606
- BULATI, M., BUFFA, S., MARTORANA, A., ET AL. Double Negative (IgG+IgD-CD27-) B Cells are Increased in a Cohort of Moderate-Severe Alzheimer's Disease Patients and Show a Pro-Inflammatory Trafficking Receptor Phenotype. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015, **44**, 1241–1251. 1875890. ISSN 13872877
- CAO, C., ARENDASH, G.W., DICKSON, A., ET AL. A β -specific Th2 cells provide cognitive and pathological benefits to Alzheimer's mice without infiltrating the CNS. *Neurobiology of Diseases*. 2009, **34**, 63–70. ISSN 09699961
- CHANDOGA, J., JUNGOVÁ, P., KOLEJÁKOVÁ, K., et al. Molekulárno-genetické a biochemické aspekty neurogenetických ochorení (Ochorenia podmienené molekulárno-genetickými patológiami štruktúrnych konštituentov nervového systému - časť 1). *Neurologie pro praxi*. 2013, **14** (4), 169–174. ISSN 12131814, 18035280
- CHEN, C., DING, X., AKRAM, N., et al. Fused in Sarcoma: Properties, Self-Assembly and Correlation with Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 2019, **24** (8), 1622. ISSN 1420-3049. ISSN 2158-3188
- CHEN, S.-H., TIAN, D.-Y., SHEN, Y.-Y., ET AL. Amyloid – β uptake by blood monocytes is reduced with ageing and Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry*. 2020, **10**, 423.
- CHENG, Y., TIAN, D.-Y., WANG, Y.-J. Peripheral clearance of brain-derived A β in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic perspectives. *Translational Neurodegeneration*. 2020, **9**, 16. ISSN 2047-9158
- CHIARINI, A., ARMATO, U., HU, P., DAL PRÀ, I. Danger-Sensing/Patten Recognition Receptors and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**, 9036. ISSN 1422-0067

- CHITNIS, T., WEINER, H.L. CNS inflammation and neurodegeneration. *Journal of Clinical Investigation*. 2017, **127**, 3577–3587. ISSN 0021-9738, 1558-8238
- 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*. 2014, **35** (7), 3132–3142. ISSN 1097-0193
- CICCARELLI, O., BARKHOF, F., BODINI, B., ET AL. Pathogenesis of multiple sclerosis: insights from molecular and metabolic imaging. *The Lancet Neurology*. 2014, **13**, 807–822. ISSN 14744422
- CORACI, I.S., HUSEMANN, J., BERMAN, J.W., ET AL. CD36, a Class B Scavenger Receptor, Is Expressed on Microglia in Alzheimer's Disease Brains and Can Mediate Production of Reactive Oxygen Species in Response to β -Amyloid Fibrils. *The American Journal of Pathology*. 2002, **160**, 101–112. ISSN 00029440
- CORNEJO, F., VRUWINK, M., METZ, C., ET AL. Scavenger Receptor-A deficiency impairs immune response of microglia and astrocytes potentiating Alzheimer's disease pathophysiology. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2018, **69**, 336–350. ISSN 08891591
- CORSETTI, V., BORRECA, A., LATINA, V., ET AL. Passive immunotherapy for N-truncated tau ameliorates the cognitive deficits in two mouse Alzheimer's disease models. *Brain Communications*. 2020, **2**, fcaa039. ISSN 2632-1297
- CRUZ HERNÁNDEZ, J.C., BRACKO, O., KERSBERGEN, C.J., ET AL. Neutrophil adhesion in brain capillaries reduces cortical blood flow and impairs memory function in Alzheimer's disease mouse models. *Nature Neuroscience*. 2019, **22**, 413–420. ISSN 2632-1297
- DALAKAS, M.C., ALEXOPOULOS, H., SPAETH, P.J. Complement in neurological disorders and emerging complement-targeted therapeutics. *Nature Reviews Neurology*. 2020, **16**, 601–617. ISSN 1759-4758, 1759-4766
- DANSOKHO, C., AIT AHMED, D., AID, S., ET AL. Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology. *Brain*. 2016, **139**, 1237–1251. ISSN 0006-8950, 1460-2156
- DE MENA, L., LOPEZ-SCARIM, J., LINCON-LIMAS D.E. TDP-43 and ER Stress in Neurodegeneration: Friends or Foes? *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2021, **14**, ISSN 1662-5099
- 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*. 2012, **33** (7), 1253–1257. ISSN 0197-4580
- 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*. 2015, **11** (12), 1461–1469. ISSN 1552-5260

DECZKOWSKA, A., WEINER, A., AMIT, I. The Physiology, Pathology, and Potential Therapeutic Applications of the TREM2 Signaling Pathway. *Cell*. 2020, **181**, 1207–1217. ISSN 00928674

DEVENNEY, E. M., AHMED, R. M., HODGES, J.R. Frontotemporal dementia, *Elsevier* [online]. 2019, **167**, 279–299. ISBN 978-0-12-804766-8

DIONISIO-SANTOS, D.A., OLSCHOWKA, J.A., O'BANION, M.K. Exploiting microglial and peripheral immune cell crosstalk to treat Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*. 2019, **16**, 74. ISSN 1742-2094

DODEL, R., BALAKRISHNAN, K., KEYVANI, K., ET AL. Naturally Occurring Autoantibodies against-Amyloid: Investigating Their Role in Transgenic Animal and In Vitro Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*. 2011, **31**, 5847–5854. ISSN 0270-6474, 1529-2401

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*. 2007, **6** (8), 734–746. ISSN 14744422

DUBOIS, B., FELDMAN, H. H., JACOVA, C., et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol*. 2010, **9** (11), 1118–1127. ISSN 1474-4422

EIKELENBOOM, P., STAM, F.C. Immunoglobulins and complement factors in senile plaques: An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathologica*. 1982, **57**, 239–242. ISSN 0001-6322, 1432-0533

EL KHOURY, J., TOFT, M., HICKMAN, S.E., ET AL. 2007. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nature Medicine*. 2007, **13**, 432–438. ISSN 1078-8956, 1546-170X

ENNERFELT, H.E., LUKENS, J.R. The role of innate immunity in Alzheimer's disease. *Immunological Reviews*. 2020, **297**, 225–246. ISSN 0105-2896, 1600-065X

FENG, Y., XIA, Y., YU, G.ET AL. Cleavage of GSK-3 β by calpain counteracts the inhibitory effect of Ser9 phosphorylation on GSK-3 β activity induced by H₂O₂. *Journal of Neurochemistry*. 2013, **126**, 234–242. ISSN 00223042

FENG, Y.-S., TAN, Z.-X., WU, L.-Y., ET AL. The involvement of NLRP3 inflammasome in the treatment of Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*. 2020, **64**, 101192. ISSN 15681637

FEREIDAN-ESFAHANI, M., NAYFEH, T., WARRINGTON, A. et al. IgM natural autoantibodies in physiology and the treatment of disease. *Methods Mol Biol*. 2019, **1904**, 53-81

- 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. *International Journal of Neuroscience*. 2015, **125** (9), 645–654. ISSN 1563-5279
- FOLKE, J.; FERREIRA, N.; BRUDEK, T.; et al. Passive Immunization in Alpha-Synuclein Preclinical Animal Models. *Biomolecules* 2022, **12**, 168
- GAN, L., YE, S., CHU, A., ET AL. Identification of Cathepsin B as a Mediator of Neuronal Death Induced by A β -activated Microglial Cells Using a Functional Genomics Approach. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, **279**, 5565–5572. ISSN 00219258
- GATE, D., SALIGRAMA, N., LEVANTHAL, O., ET AL. Clonally expanded CD8 T cells patrol the cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease: Molecular and cell biology: Inflammatory and microglia-mediated mechanisms in AD. *Alzheimer's and Dementia*. 2020, **16**. ISSN 1552-5260, 1552-5279
- GREN, S.T., RASMUSSEN, T.B., JANCIAUSKIENE, S., ET AL. A Single-Cell Gene-Expression Profile Reveals Inter-Cellular Heterogeneity within Human Monocyte Subsets. *PLoS ONE*. 2015, **10**, e0144351. ISSN 1932-6203
- HADDAD-TÓVOLI, R., DRAGANO, N.R.V., RAMALHO, A.F.S., ET AL. Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control. *Frontiers in Neuroscience*. 2017, **11**, 224. ISSN 1662-453X
- HARTNELL, I.J., BLUM, D., NICOLL, J.A.R., ET AL. Glial cells and adaptive immunity in frontotemporal dementia with tau pathology. *Brain*. 2021, **144**, 724–745 . ISSN 0006-8950, 1460-2156
- HASHEMI, E., MALARKANNAN, S. Tissue-Resident NK Cells: Development, Maturation, and Clinical Relevance. *Cancers*. 2020, **12**, 1553. ISSN 2072-6694
- HAWKSWORTH, O.A., COULTHARD, L.G., WOODRUFF, T.M. Complement in the fundamental processes of the cell. *Molecular Immunology*. 2017, **84**, 17–25. ISSN 01615890
- HAYES, M.T. Parkinson's disease and Parkinsonism. *The American Journal of Medicine*. 2019, **132** (7), 802-807
- HEAD, E., POWELL, D., GOLD, B. T., et al. Alzheimer's Disease in Down Syndrome. *European Journal of Neurodegenerative Diseases*. 2012, **1** (3), 353–364.
- HEALY, L.M., PERRON, G., WON, S.-Y., ET AL. MerTK Is a Functional Regulator of Myelin Phagocytosis by Human Myeloid Cells. *The Journal of Immunology*. 2016, **196**, 3375–3384. ISSN 0022-1767, 1550-6606
- HENEKA, M.T., MCMANUS, R.M., LATZ, E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018, **19**, 610–621. ISSN 1471-003X, 1471-0048

- HERNANDEZ, M.X., JIANG, S., COLE, T.A., ET AL. Prevention of C5aR1 signaling delays microglial inflammatory polarization, favors clearance pathways and suppresses cognitive loss. *Molecular Neurodegeneration*. 2017,**12**, 66. ISSN 1750-1326
- HICKMAN, S., IZZY, S., SEN, P., ET AL. Microglia in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*. 2018, **21**, 1359–1369. ISSN 1097-6256, ISSN 1546-1726
- HICKMAN, S.E., ALLISON, E.K., EL KHOURY, J. Microglial Dysfunction and Defective-Amyloid Clearance Pathways in Aging Alzheimer's Disease Mice. *Journal of Neuroscience*. 2008, **28**, 8354–8360. ISSN 0270-6474, 1529-2401
- HICKMAN, S.E., KINGERY, N.D., OHSUMI, T.K., ET AL. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature Neuroscience*. 2013, **16**, 1896–1905. ISSN 1097-6256, 1546-1726
- HIRSCH E.C., STANDAERT D.G. Ten Unsolved Questions About Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2021, **36(1)**:16-24.
- 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*. 2015, **289**, 121–129
- JANKOVIĆ, B.D., DJORDJIJEVIĆ, D. Differential Appearance of Autoantibodies to Human Brain S100 Protein, Neuron Specific Enolase and Myelin Basic Protein in Psychiatric Patients. *International Journal of Neuroscience*. 1991, **60**, 119–127
- JANKOVIC, J., AGUILAR, L. G. Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatric Disease Treatment*. 2008, 4 (4), 743–757. ISSN 0020-7454, 1543-5245
- JEVTIC, S., SENGAR, A.S., SALTER, M.W., ET AL. The role of the immune system in Alzheimer disease: Etiology and treatment. *Ageing Research Review*. 2017, **40**, 84–94. ISSN 15681637
- KALARIA, R. N., The pathology and pathophysiology of vascular dementia. *Neuropharmacology*. 2018, **134**, 226–239. ISSN 0028-3908.
- KHAN, S., BARVE, K., H., KUMAR., M.: Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol*. 2020, 18 (**11**), 1106-1125. ISSN 32484110
- KLOS, A., WENDE, E., WAREHAM, K.J., ET AL. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVII. Complement Peptide C5a, C4a, and C3a Receptors. *Pharmacological Reviews*. 2013, **65**, 500–543. ISSN 0031-6997, 1521-0081

- 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*. **8** (5), e64649
- KRANCE, S.H., WU, C.-Y., ZOU, Y., ET AL. The complement cascade in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Molecular Psychiatry*. 2021, **26**, 5532–5541. ISSN 1359-4184, 1476-5578
- 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*. 2015, **11** (10), 1180–1190. ISSN 1552-5260.
- LANANNA, B.V., MCKEE C.A., KING, M.W, et al. Chi3L1/YKL-40 is controlled by the astrocyte circadian clock and regulates neuroinflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Sci Transl Med*. 2020, 12 (574), eaax3519
- LAURENT, C., DOROTHÉE, G., HUNOT, S., ET AL. Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. *Brain*. 2017, **140**, 184–200. ISSN 0006-8950, 1460-2156
- LE PAGE, A., BOURGADE, K., LAMOUREUX, J., ET AL. NK Cells are Activated in Amnesic Mild Cognitive Impairment but not in Mild Alzheimer's Disease Patients. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015, **46**, 93–107. ISSN 13872877, 18758908
- LEE, M.S., KIM, Y.-J., Signaling Pathways Downstream of Pattern-Recognition Receptors and Their Cross Talk. *Annual Review of Biochemistry*. 2007, **76**, 447–480. 0066-4154, 1545-4509
- LEONARDO, C.C., HALL, A.A., COLLIER, L.A., ET AL. Inhibition of gelatinase activity reduces neural injury in an ex vivo model of hypoxia–ischemia. *Neuroscience*. 2009, **160**, 755–766. ISSN 03064522
- LI, S., HAYDEN, E.Y., GARCIA, V.J., ET AL. Activated Bone Marrow-Derived Macrophages Eradicate Alzheimer's-Related A β 42 Oligomers and Protect Synapses. *Frontiers in Immunology*. 2020, **11**, 49. ISSN 1664-3224
- LINDESTAM ARLEHAMN, C.S., GARRETTI, F., SULZER, D., ET AL. Roles for the adaptive immune system in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Current Opinion in Immunology*. 2019, **59**, 115–120. ISSN 09527915
- LISTON, A., MASTERS, S.L., 2017. Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation. *Nature Reviews Immunology*. 2017, **17**, 208–214. ISSN 1474-1733, 1474-1741. ISSN 1474-1733, 1474-1741
- 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*. 2017, **13** (7), 778-772.

- MAEZAWA, I., JIN, L.W. Rett Syndrome Microglia Damage Dendrites and Synapses by the Elevated Release of Glutamate. *Journal of Neuroscience*. 2010, **30**, 5346–5356. ISSN 0270-6474, 1529-2401
- 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. 2013, **8**(7): e68996. ISSN 1932-6203.
- MARSH, S.E., ABUD, E.M., LAKATOS, A., ET AL. The adaptive immune system restrains Alzheimer's disease pathogenesis by modulating microglial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016, **113**. ISSN 0027-8424, 1091-6490
- MARTIN, E., BOUCHER, C., FONTAINE, B. Distinct inflammatory phenotypes of microglia and monocyte-derived macrophages in Alzheimer's disease models: effects of aging and amyloid pathology. *Aging Cell*. 2017, **16**, 27–38. ISSN 14749718
- MARTIN, F., OLIVER, A.M., KEARNEY, J.F. Marginal Zone and B1 B Cells Unite in the Early Response against T-Independent Blood-Borne Particulate Antigens. *Immunity*. 2001, **14**, 617–629. ISSN 10747613
- MCMANUS, R.M., MILLS, K.H.G., LYNCH, M.A. T Cells-Protective or Pathogenic in Alzheimer's Disease? *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2015, **10**, 547–560. ISSN 1557-1890, 1557-1904
- MECOCCHI, 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*. 1995, **57** (1), 165–17090. ISSN 0165-5728, 1872-8421.
- MENESES A, KOGA S, O'LEARY J. TDP-43 Pathology in Alzheimer's Disease. *Mol Neurodegener*. 2021;16(1):84.
- MIKLOSSY, J. Bacterial Amyloid and DNA are Important Constituents of Senile Plaques: Further Evidence of the Spirochetal and Biofilm Nature of Senile Plaques. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2016, **53**, 1459–1473. ISSN 13872877, 18758908
- MINERS, J.S., CLARKE, P., LOVE, S. Clusterin levels are increased in Alzheimer's disease and influence the regional distribution of A β : Clusterin Influences the Regional Distribution of A β . *Brain Pathology*. 2017, **27**, 305–313. ISSN 10156305
- MOLENHAUER, B., DAKNA, M., KRUSE, N., et al. Validation of serum Neurofilament light chain as a biomarker of Parkinson's disease progression. *Mov Disord*. 2020, 35 (11), 1999-2008
- MONSONEGO, A., NEMIROVSKY, A., HARPAZ, I. CD4 T cells in immunity and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Immunology*. 2013, **139**, 438–446. ISSN 00192805

- MRDJEN, D., PAVLOVIC, A., HARTMANN, F.J., ET AL. High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease. *Immunity*. 2018, **48**, 380-395.e6. ISSN 10747613
- MULLER, M.K., JACOBI, E., SAKIMURA, K. et al. NMDA receptors mediate synaptic depression, but not spine loss in the dentate gyrus of adult amyloid β overexpressing mice. *Acta Neuropathol Commun*. 2018, **6**, 110
- NATAF, S., GUILLEN, M., PAYS, L. Common Neurodegeneration-Associated Proteins Are Physiologically Expressed by Human B Lymphocytes and Are Interconnected via the Inflammation/Autophagy-Related Proteins TRAF6 and SQSTM1. *Frontiers in Immunology*. 2019, **10**, 2704. ISSN 1664-3224
- OBERSTEIN, T.J., TAHA, L., SPITZER, P., ET AL. Imbalance of Circulating Th17 and Regulatory T Cells in Alzheimer's Disease: A Case Control Study. *Frontiers in Immunology*. 2018, **9**, 1213. ISSN 1664-3224
- 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*. 2016, **15** (7), 673–684
- PARK, J., BAIK, S.H., MOOK-JUNG, I. Mimicry of Central-Peripheral Immunity in Alzheimer's Disease and Discovery of Neurodegenerative Roles in Neutrophil. *Frontiers in Immunology*. 2019, **10**, 2231. ISSN 1664-3224
- PASCUAL, G., WADIA, J. S., ZHU, X., ET AL. Immunological memory to hyperphosphorylated tau in asymptomatic individuals. *Acta Neuropathologica*. 2017, **133**, 767–783. ISSN 1432-0533
- PEDERSEN, J. T., SIGURDSSON, E.M. Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2015, **21** (6), 394–402. ISSN 1471-4914, 1471-499X.
- PRABHUDAS, M.R., BALDWIN, C.L., BOLLYKY, P.L. A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *The Journal of Immunology*. 2017, **198**, 3775–3789. ISSN 0022-1767, 1550-6606
- PRINZ, M., PRILLER, J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nature Neuroscience*. 2017, **20**, 136–144. ISSN 1097-6256, 1546-1726
- RANSOHOFF, R.M., KHOURY, J.E. Microglia in Health and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016, **8**, a020560. ISSN 1943-0264
- RASMUSSEN, K.L., NORDESTGAARD, B.G., FRIKKE-SCHMIDT, R. An updated Alzheimer hypothesis: Complement C3 and risk of Alzheimer's disease - A cohort study of 95,442 individuals. *Alzheimer's and Dementia*. 2018, **14**, 1589–1601. ISSN 1552-5260, 1552-5279

- READHEAD, B., HAURE-MIRANDE, J.-V., FUNK, C.C. Multiscale Analysis of Independent Alzheimer's Cohorts Finds Disruption of Molecular, Genetic, and Clinical Networks by Human Herpesvirus. *Neuron*. 2018, **99**, 64-82.e7, ISSN 08966273
- REKTOROVÁ, I., 2006. Frontotemporální lobární degenerace – diagnóza z neuropsychiatrického pomezí. *Neurologie pro praxi*. 2006, **7** (4), 199-202
- 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*. 2018, 97–138
- SABATINO, J.J., PRÖBSTEL, A.-K., ZAMVIL, S.S. B cells in autoimmune and neurodegenerative central nervous system diseases. *Nature Reviews Neuroscience*. 2019, **20**, 728–745. ISSN 1471-003X, 1471-0048
- SARESELLA, M., CALABRESE, E., MARVENTANO, I. Increased activity of Th-17 and Th-9 lymphocytes and a skewing of the post-thymic differentiation pathway are seen in Alzheimer's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2011, **25**, 539–547. ISSN 08891591
- SARESELLA, M., MARVENTANO, I., CALABRESE, E. A Complex Proinflammatory Role for Peripheral Monocytes in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2013, **38**, 403–413. ISSN 18758908, 13872877
- SEIFERT, M., KÜPPERS, R. Human memory B cells. *Leukemia*. 2016, **30**, 2283–2292. ISSN 0887-6924, 1476-5551
- 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*. 2020, **61**, 29–39. ISSN 09594388.
- SIRKIS, D.W., BINHAM, L.W., KARCH, C.M. Immunological signatures in frontotemporal lobar degeneration. *Curr Opin Neurol*. 2019, **32** (2), 272-278, ISSN 8025661
- SHI, M., CHU, F., TIAN, X. Role of Adaptive Immune and Impacts of Risk Factors on Adaptive Immune in Alzheimer's Disease: Are Immunotherapies Effective or Off-Target? *Neuroscientist*. 2021, **107385842098722**. ISSN 1073-8584, 1089-4098
- 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*. 2012, **7** (12), e52285. ISSN 1932-6203.
- SORIA LOPEZ J.A., GONZÁLEZ H.M., LÉGER G.C. Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology*. 2019, **167**, 231-255. ISSN 804766-8.00013-3

- ST-AMOUR, I., BOSOI, C.R., PARÉ, I. Peripheral adaptive immunity of the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*. 2019, **16**, 3. ISSN 1742-2094
- STEFANIS, L. α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012, **2** (2), a009399. ISSN 2157-1422.
- STOCK, A.J., KASUS-JACOBI, A., PEREIRA, H.A., 2018. The role of neutrophil granule proteins in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*. 2018, **15**, 240. ISSN 1742-2094
- STRIMBU, K., TAVEL, J. A. What are Biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS*. 2010, **5** (6), 463–466. ISSN 1746-630X.
- SUN, M. - K. Potential Therapeutics for Vascular Cognitive Impairment and Dementia. *Current Neuropharmacology*. 2018, **16** (7), 1036–1044. ISSN 1875-6190.
- THOME, A.D., FARIDAR, A., BEERS, D.R. Functional alterations of myeloid cells during the course of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*. 2018, **13**, 61. ISSN 1750-1326
- TAN, Z., JIANG, J., TIAN, F., et al. Serum Visinin-like protein 1 is a better biomarker than neuron-specific enolase for seizure-induced neuronal injury. A prospective and observational study. *Front Neurol*. 2020, **25**, 11, 567587
- ULMANOVÁ, O., RŮŽIČKA, E. Parkinsonova nemoc-základy terapie a diferenciální diagnostiky-základy terapie a diferenciální diagnostiky. *Psychiatrie pro Praxi*. 2007, **2**, 60-62. ISSN 12130508, 18035272.
- UNGER, M.S., LI, E., SCHARNAGL, L., POUPARDIN, R. CD8+ T-cells infiltrate Alzheimer's disease brains and regulate neuronal- and synapse-related gene expression in APP-PS1 transgenic mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2020, **89**, 67–86. ISSN 08891591
- VAN DER HOVEN, J., VAN HUMMEL, A., PRZYBYŁA, M. Contribution of endogenous antibodies to learning deficits and astrogliosis in human P301S mutant tau transgenic mice. *Scientific Reports*. 2020, **10**, 13845. ISSN 2045-2322
- VENEGAS, C., HENEKA, M. Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease. *Journal of Leukocyte Biology*. 2017, **101** (1), 87-98. ISSN 0741-5400, 1938-3673
- VIDA, C., MARTINEZ DE TODA, I., GARRIDO, A. Impairment of Several Immune Functions and Redox State in Blood Cells of Alzheimer's Disease Patients. Relevant Role of Neutrophils in Oxidative Stress. *Frontiers in Immunology*. 2018, **8**, 1974. ISSN 1664-3224

- VODOPIVEC, I., GALICHET, A., KNOBLOCH, M. RAGE Does Not Affect Amyloid Pathology in Transgenic ArcA β Mice. *Neurodegenerative Diseases*. 2009, **6**, 270–280. ISSN 1660-2854, 1660-2862
- WILLIAMS-GRAY, C.H., WIJEYEKOON, R.S., SCOTT, K.M. Abnormalities of age-related T cell senescence in Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*. 2018, **15**, 166. ISSN 1742-2094
- WOLTERS, F.J., IKRAM, M.A. Epidemiology of vascular dementia. *Arteriocler Thromb Vasc Biol*. 2019, **39** (8), 1542-1549, 31294622
- WOOLFSON, R.G., LACHMANN, H. Improvement in renal cholesterol emboli syndrome after simvastatin. *The Lancet*. 1998, **351**, 1331–1332. ISSN 01406736
- WU, J., LI, L. Autoantibodies in Alzheimer's disease: potential biomarkers, pathogenic roles, and therapeutic implications. *Journal of Biomedical Research*. 2016, **30** (5), 361–372
- WU, K.-M., ZHANG, Y.-R., HUANG, Y.-Y. The role of the immune system in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*. 2021, **70**, 101409. ISSN 15681637
- XIONG, F., GE, W., MA, C. Quantitative proteomics reveals distinct composition of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*. 2019, **15**, 429–440. ISSN 1552-5260, 1552-5279
- YIN, C., ACKERMANN, S., MA, Z. ApoE attenuates unresolvable inflammation by complex formation with activated C1q. *Nature Medicine*. 2019, **25**, 496–506. ISSN 1078-8956, 1546-170X
- ZENARO, E., PIETRONIGRO, E., BIANCA, V.D. Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nature Medicine*. 2015, **21**, 880–886. ISSN 1078-8956, 1546-170X
- 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*. 2010, **45** (1), 23–29. ISSN 1873-6815.
- ZHANG, J., KE, K.-F., LIU, Z., Th17 Cell-Mediated Neuroinflammation Is Involved in Neurodegeneration of A β 1-42-Induced Alzheimer's Disease Model Rats. *PLoS ONE*. 2013a, **8**, e75786. ISSN 1932-6203
- ZHANG, Y., FUNG, I.T.H., SANKAR, P. Depletion of NK Cells Improves Cognitive Function in the Alzheimer Disease Mouse Model. *The Journal of Immunology*. 2020, **205**, 502–510. ISSN 0022-1767, 1550-6606

ZINDEL, J., KUBES, P., DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2020, **15**, 493–518. ISSN 1553-4006, 1553-4014

ZWIRNER J., LIER J., FRANKE H., et al. GFAP positivity in neurons following traumatic brain injuries. *International Journal of Legal Medicine*. 2021 Nov;135(6):2323-2333. ISSN 0937-9827, 1437-1596

10 PŘÍLOHY

Tabulka 23: Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro Alzheimerovu chorobu, 1. část.

Diagnóza	Vzorek	TREM2	MCP-1	α - synuclein	NfI	MBP	NSE	TDP-43
AD	827	= 0+	= +	= +	= ++	= ++	= 0+	= 0+
AD	830	= +	= ++	= +	= +	= +	= +	= 0
AD	839	= 0	= +	= +	= +	= +	= +	= +
AD	841	= +	= ++	= +	= +	= +	= ++	= ++
AD	844	= +	= +	= +	= ++	= +	= +	= 0+
AD	873	= +	= +	= +	= ++	= +	= ++	= +
AD	768	= +	= +	= 0-	= +	= 0-	= 0	= -
AD	777	= +	= -	= -	= +	= 0	= 0-	= 0
AD	778	= +	= -	= -	= +	= 0	= 0-	= 0-
AD	784	= -	= -	= -	= +	= -	= -	= -
AD	790	= +	= 0	= 0+	= +	= 0	= 0-	= -
AD	793	= +	= 0	= -	= +	= 0-	= 0	= -
AD	794	= +	= 0-	= -	= +++	= 0	= 0	= 0-
AD	806	= +	= +	= ++	= +	= +	= 0+	= 0+
AD	794	= ++	= -	= 0	= 0	= 0	= 0	= 0
AD	52	= +	= 0	= 0	= +	= 0	= 0	= +
AD	152	= ++	= 0-	= -	= ++	= 0-	= -	= -
AD	55	= 0	= -	= -	= +++	= 0	= 0-	= 0-
AD	151	= +	= 0	= +	= 0	= 0	= 0+	= 0
AD	87	= 0+	= +	= 0	= 0+	= 0	= +	= +
AD	52	= +	= +	= +	= +	= +	= +	= 0+
AD	160	= +	= ++	= +	= ++	= +	= +++	= ++
AD	81	= ++	= ++	= ++	= ++	= ++	= +++	= +
AD	77	= +	= +++	= 0+	= +++	= +	= ++	= +
AD	87	= +	= +	= 0+	= ++	= +	= +	= ++
AD	52	= 0+	= 0	= 0	= +	= 0	= 0	= +
AD	37	= 0	= +	= 0+	= +	= 0	= 0+	= 0+
AD	747	= +	= ++	= +	= +	= ++	= +	= +
AD	36	= ++	= ++	= +	= +	= ++	= +	= ++
AD	515	= 0	= +	= 0	= +	= 0+	= ++	= 0

Tabulka 24: Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro Alzheimerovu chorobu, 2. část

Diagnóza	Vzorek	FUS	Amyloid β 1-40	NGRN	CHI3Li	GFAP	Tau 441	VSNL1
AD	827	= ++	= +	= +++	= +	= +++	= +	= ++
AD	830	= +	= +	= +++	= +	= +++	= +	= ++
AD	839	= +++	= +	= +++	= 0+	= +++	= ++	= +
AD	841	= ++	= ++	= +++	= +	= +++	= ++	= ++
AD	844	= ++	= 0+	= ++	= +	= ++	= ++	= ++
AD	873	= ++	= +	= ++	= +	= ++	= +	= ++
AD	768	= 0	= -	= +	= 0-	= -	= +	= -
AD	777	= 0	= 0	= +	= 0	= 0	= +	= 0
AD	778	= 0	= 0	= 0+	= 0	= 0-	= 0+	= +
AD	784	= +	= 0	= 0+	= -	= -	= 0+	= -
AD	790	= 0-	= 0	= +	= -	= 0-	= +++	= 0-
AD	793	= 0	= -	= +	= -	= -	= +	= 0+
AD	794	= +	= -	= +	= -	= -	= 0-	= 0
AD	806	= +	= +	= +	= +	= +	= +	= +
AD	794	= ++	= -	= 0	= +	= 0	= 0	= -
AD	52	= 0	= 0	= +	= -	= -	= +	= 0
AD	152	= -	= -	= 0-	= 0	= 0-	= +	= 0
AD	55	= 0-	= 0-	= 0-	= +	= ++	= ++	= +
AD	151	= 0+	= 0	= 0	= 0	= 0	= +	= 0
AD	87	= +	= +	= +	= 0	= 0	= +	= 0
AD	52	= 0-	= 0	= 0	= 0	= 0	= +	= 0+
AD	160	= ++	= ++	= +	= 0	= +	= ++	= +
AD	81	= ++	= ++	= ++	= ++	= +	= +	= +
AD	77	= 0+	= +	= +	= +	= +	= +++	= ++
AD	87	= 0	= +	= ++	= 0+	= 0	= ++	= +
AD	52	= 0	= 0	= +	= 0-	= 0	= +	= 0-
AD	37	= +	= +	= +	= 0-	= 0	= ++	= 0
AD	747	= +	= +	= ++	= +	= +	= ++	= ++
AD	36	= +	= +	= ++	= +	= +	= ++	= ++
AD	515	= 0+	= 0	= 0	= 0+	= 0	= +	= +

Tabulka 25: Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro frontotemporální lobární degeneraci.

Diagnóza	Vzorek	TREM2	MCP-1	α -synuclein	Nfl	MBP	NSE	TDP-43
FTD	823	= +	= ++	= ++	= ++	= ++	= ++	= +
FTD	875	= ++	= +	= +	= ++	= +	= +	= 0+
FTD	818	= +	= +	= +	= ++	= ++	= ++	= 0+
FTD	83	= ++	= -	= +++	= 0+	= 0-	= -	= -
FTD	94	= +	= 0-	= 0	= +	= 0	= 0+	= 0-
FTD	36	= 0+	= 0-	= 0	= 0+	= 0	= +	= 0
FTD	66	= +	= 0	= -	= 0	= 0-	= -	= -
FTD	99	= 0	= 0	= -	= +	= +	= 0+	= -
FTD	144	= +	= 0+	= +	= +	= +	= ++	= +
FTD	75	= +	= +	= ++	= ++	= 0+	= +++	= 0+
FTD	162	= +	= ++	= +	= ++	= +	= +++	= ++
FTD	511	= 0	= 0	= 0	= +	= +	= 0	= 0+
FTD	852	= 0+	= +	= 0	= +	= +	= 0+	= +
FTD	870	= +	= +	= +	= ++	= +	= ++	= ++

Tabulka 26: Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro frontotemporální lobární degeneraci,

2. část

Diagnóza	Vzorek	FUS	Amyloid β 1-40	NRG	CHI3Li	GFAP	Tau 441	VSNL1
FTD	823	= +++	= +	= +++	= +	= +	= +	= +
FTD	875	= +++	= +	= ++	= +	= ++	= +	= ++
FTD	818	= +	= 0	= 0	= 0+	= 0	= +	= +
FTD	83	= -	= -	= 0-				
FTD	94	= +	= 0+	= +	= -	= 0+	= +	= 0-
FTD	36	= 0-	= -	= +	= 0	= 0+	= 0	= 0
FTD	66	= -	= -	= -	= 0-	= 0	= 0	= 0
FTD	99	= 0-	= 0	= +	= 0	= 0	= +	= +
FTD	144	= 0	= 0	= 0	= 0	= 0	= +++	= 0+
FTD	75	= 0+	= +	= +	= +	= 0+	= ++	= +
FTD	162	= +	= 0	= +	= +	= +	= +	= +
FTD	511	= 0	= 0	= +	= 0+	= 0	= +	= 0
FTD	852	= +	= ++	= ++	= 0	= 0	= 0	= +
FTD	870	= +++	= +	= ++	= +	= ++	= +	= ++

Tabulka 27: Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro Parkinsonovu chorobu, 1. část

Diagnóza	Vzorek	TREM2	MCP-1	α -synuclein	Nfl	MBP	NSE	TDP-43
PD	820	= -	= 0	= +	= +	= +	= ++	= +
PD	832	= 0	= ++	= +	= +	= 0	= +	= +
PD	855	= +	= +	= +	= ++	= +	= ++	= +
PD	796	= 0+	= 0	= 0	= +	= +	= 0	= 0
PD	805	= +	= 0+	= +	= +	= +	= 0	= 0
PD	820	= +	= 0	= +	= +	= +	= +	= +
PD	796	= -	= -	= -	= 0	= ++	= 0	= -
PD	265	= +	= 0	= -	= 0+	= 0-	= 0+	= 0
PD	265	= 0+	= +	= 0	= +	= 0	= 0+	= 0

Tabulka 28: Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro Parkinsonovu chorobu, 2. část

Diagnóza	Vzorek	FUS	Amyloid β 1-40	NGRN	CHI3Li	GFAP	Tau 441	VSNL1
PD	820	= +++	= +	= +++	= +	= +	= +	= +
PD	832	= ++	= +	= +++	= +	= +++	= +	= ++
PD	855	= ++	= +	= +++	= +	= +++	= ++	= ++
PD	796	= 0	= 0-	= 0	= +	= +	= +	= +
PD	805	= 0	= 0+	= 0+	= 0	= +	= +	= 0
PD	820	= 0	= 0	= +	= 0	= 0+	= ++	= 0
PD	796	= 0	= -	= 0	= +	= -	= -	= 0
PD	265	= 0	= 0	= 0+	= +	= 0	= 0	= 0
PD	265	= 0	= 0	= +	= 0	= 0	= +	= 0

Tabulka 29: Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro vaskulární demenci, 1. část

Diagnóza	Vzorek	TREM2	MCP-1	α -synuclein	Nfl	MBP	NSE	TDP-43
VD	807	= +	= 0	= +	= +	= +	= 0	= 0
VD	807	= +	= 0	= +	= +	= +	= +	= 0+
VD	517	= +	= 0	= 0	= 0+	= 0	= +	= 0
VD	726	= 0	= +	= 0-	= +	= 0	= +	= 0
VD	625	= +	= +	= 0	= ++	= 0+	= +++	= 0+
VD	681	= +	= +	= +	= ++	= ++	= ++	= ++
VD	681	= +	= +++	= +	= +++	= ++	= ++	= ++
VD	625	= 0	= 0	= 0-	= +	= +	= +	= 0

VD	834	= +	= ++	= +	= +	= ++	= ++	= ++
VD	834	= ++	= +	= +	= +	= +	= +	= 0+

Tabulka 30: Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro vaskulární demenci, 2. část

Diagnóza	Vzorek	FUS	Amyloid β 1-40	NGRN	CHi3Li	GFAP	Tau 441	VSNL1
VD	807	= +	= +	= 0	= +	= +	= +	= +
VD	807	= +	= -	= +	= 0-	= 0+	= ++	= +
VD	517	= 0	= 0	= 0+	= +	= -	= 0	= 0
VD	726	= +	= 0	= 0+	= 0	= 0	= 0	= 0+
VD	625	= 0	= 0	= +	= +	= 0	= ++	= +
VD	681	= +	= +	= +	= +	= +	= +	= +
VD	681	= ++	= ++	= ++	= ++	= ++	= ++	= ++
VD	625	= +	= 0	= 0+	= +	= +	= +	= +
VD	834	= ++	= ++	= +++	= +	= +++	= +	= ++
VD	834	= +	= 0+	= ++	= +	= +	= ++	= ++

Tabulka 31: Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro negativí kontrolu, 1. část

Diagnóza	Vzorek	TREM2	MCP-1	α - synuclein	Nfl	MBP	NSE	TDP-43
NK	30	= +	= 0+	= 0	= ++	= 0+	= -	= -
NK	71	= +	= 0	= +	= ++	= 0+	= 0-	= -
NK	56	= +	= 0	= 0	= 0+	= 0	= -	= 0
NK	71	= ++	= 0	= 0	= +	= +	= +	= 0+
NK	140	= ++	= 0	= 0	= +	= 0	= 0+	= 0
NK	56	= +	= 0+	= 0	= +	= 0+	= +	= 0
NK	105	= +	= +	= +	= +++	= +	= ++	= +
NK	30	= +	= +	= 0	= ++	= 0	= +	= 0
NK	56	= +	= 0	= 0-	= 0-	= 0+	= 0	= 0-

Tabulka 32: Výsledná tabulka „pozitivit“ u vzorků sér pacientů pro negativí kontrolu, 2. část

Diagnóza	Vzorek	FUS	Amyloid β 1-40	NGRN	CHi3Li	GFAP	Tau 441	VSNL1
NK	30	= -	= 0	= +	= 0	= -	= 0	= -
NK	71	= 0	= +	= +	= -	= 0-	= 0	= 0
NK	56	= 0	= 0	= 0	= 0	= 0	= 0	= 0

NK	71	= ++	= 0+	= 0+	= 0	= +	= +	= 0+
NK	140	= +	= 0	= +	= 0	= 0	= +	= 0
NK	56	= +	= +	= +	= 0	= 0	= +	= 0-
NK	105	= 0+	= +	= +	= 0+	= 0+	= ++	= ++
NK	30	= 0	= 0	= +	= 0	= 0	= +	= 0
NK	56	= 0	= 0	= 0+	= +	= 0	= +	= 0

Tabulka 33: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro TREM2

TREM2	Absolutní četnosti					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	5	3	18	4	0	30
FTD	2	2	8	2	0	14
PD	3	2	4	0	0	9
VD	2	0	7	1	0	10
kontrola	0	0	7	2	0	9
Celkem	12	7	44	9	0	72
TREM2	Řádkově relativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	16,7	10,0	60,0	13,3	0,0	100,0
FTD	14,3	14,3	57,1	14,3	0,0	100,0
PD	33,3	22,2	44,4	0,0	0,0	100,0
VD	20,0	0,0	70,0	10,0	0,0	100,0
kontrola	0,0	0,0	77,8	22,2	0,0	100,0
Celkem	16,7	9,7	61,1	12,5	0,0	100,0

Tabulka 34: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro MCP-1

MCP-1	Absolutní četnosti					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	12	0	11	6	1	30
FTD	6	1	5	2	0	14
PD	5	1	2	1	0	9
VD	4	0	4	1	1	10
kontrola	5	2	2	0	0	9
Celkem	32	4	24	10	2	72
MCP-1	Řádkově relativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	40,0	0,0	36,7	20,0	3,3	100,0
FTD	42,9	7,1	35,7	14,3	0,0	100,0

PD	55,6	11,1	22,2	11,1	0,0	100,0
VD	40,0	0,0	40,0	10,0	10,0	100,0
kontrola	55,6	22,2	22,2	0,0	0,0	100,0
Celkem	44,4	5,6	33,3	13,9	2,8	100,0

Tabulka 35: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro synuclein

α- synuclein	Absolutní četnosti					Celkem
	0	0+	+	++	+++	
AN	13	4	11	2	0	30
FTD	6	0	5	2	1	14
PD	4	0	5	0	0	9
VD	4	0	6	0	0	10
kontrola	7	0	2	0	0	9
Celkem	34	4	29	4	1	72
α- synuclein	Řádkově relativní četnosti (v %)					Celkem
	0	0+	+	++	+++	
AN	43,3	13,3	36,7	6,7	0,0	100,0
FTD	42,9	0,0	35,7	14,3	7,1	100,0
PD	44,4	0,0	55,6	0,0	0,0	100,0
VD	40,0	0,0	60,0	0,0	0,0	100,0
kontrola	77,8	0,0	22,2	0,0	0,0	100,0
Celkem	47,2	5,6	40,3	5,6	1,4	100,0

Tabulka 36: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro Nfl

Nfl	Absolutní četnosti					Celkem
	0	0+	+	++	+++	
AN	2	1	17	7	3	30
FTD	1	2	5	6	0	14
PD	1	1	6	1	0	9
VD	0	1	6	2	1	10
kontrola	1	1	3	3	1	9
Celkem	5	6	37	19	5	72
Nfl	Řádkově relativní četnosti (v %)					Celkem
	0	0+	+	++	+++	
AN	6,7	3,3	56,7	23,3	10,0	100,0

FTD	7,1	14,3	35,7	42,9	0,0	100,0
PD	11,1	11,1	66,7	11,1	0,0	100,0
VD	0,0	0,0	60,0	20,0	10,0	100,0
kontrola	11,1	11,1	33,3	33,3	11,1	100,0
Celkem	6,9	8,3	51,4	26,4	6,9	100,0

Tabulka 37: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro MBP

MBP	Absolutní četnosti					Celkem
	0	0+	+	++	+++	
AN	15	1	10	4	0	30
FTD	4	1	7	2	0	14
PD	3	0	5	1	0	9
VD	2	1	4	3	0	10
kontrola	3	4	2	0	0	9
Celkem	27	7	28	10	0	72
MBP	Řádkově relativní četnosti (v %)					Celkem
	0	0+	+	++	+++	
AN	50,0	3,3	33,3	13,3	0,0	100,0
FTD	28,6	7,1	50,0	14,3	0,0	100,0
PD	33,3	0,0	55,6	11,1	0,0	100,0
VD	20,0	10,0	40,0	30,0	0,0	100,0
kontrola	33,3	44,4	22,2	0,0	0,0	100,0
Celkem	37,5	9,7	38,9	13,9	0,0	100,0

Tabulka 38: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro NSE

NSE	Absolutní četnosti					Celkem
	0	0+	+	++	+++	
AN	12	4	8	4	2	30
FTD	3	3	2	4	2	14
PD	3	2	2	2	0	9
VD	1	0	5	3	1	10
kontrola	4	1	3	1	0	9
Celkem	23	10	20	14	5	72
NSE	Řádkově relativní četnosti (v %)					Celkem
	0	0+	+	++	+++	
AN	40,0	13,3	26,7	13,3	6,7	100,0
FTD	21,4	21,4	14,3	28,6	14,3	100,0

PD	33,3	22,2	22,2	22,2	0,0	100,0
VD	10,0	0,0	50,0	30,0	10,0	100,0
kontrola	44,4	11,1	33,3	11,1	0,0	100,0
Celkem	31,9	13,9	27,8	19,4	6,9	100,0

Tabulka 39: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro TDP-43

TDP-43	Absolutní četnosti					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	13	5	8	4	0	30
FTD	5	4	3	2	0	14
PD	5	0	4	0	0	9
VD	4	3	0	3	0	10
kontrola	7	1	1	0	0	9
Celkem	34	13	16	9	0	72
TDP-43	Řádkově relativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	43,3	16,7	26,7	13,3	0,0	100,0
FTD	35,7	28,6	21,4	14,3	0,0	100,0
PD	55,6	0,0	44,4	0,0	0,0	100,0
VD	40,0	30,0	0,0	30,0	0,0	100,0
kontrola	77,8	11,1	11,1	0,0	0,0	100,0
Celkem	47,2	18,1	22,2	12,5	0,0	100,0

Tabulka 40: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro FUS

FUS	Absolutní četnosti					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	11	3	8	7	1	30
FTD	6	1	4	0	3	14
PD	6	0	0	2	1	9
VD	2	0	6	2	0	10
kontrola	5	1	2	1	0	9
Celkem	30	5	20	12	5	72
FUS	Řádkově relativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	36,7	10,0	26,7	23,3	3,3	100,0
FTD	42,9	7,1	28,6	0,0	21,4	100,0
PD	66,7	0,0	0,0	22,2	11,1	100,0
VD	20,0	0,0	60,0	20,0	0,0	100,0

kontrola	55,6	11,1	22,2	11,1	0,0	100,0
Celkem	41,7	6,9	27,8	16,7	6,9	100,0

Tabulka 41: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro amyloid β

Amyloid β	Absolutní četnosti					Celkem
	0	0+	+	++	+++	
AN	15	1	11	3	0	30
FTD	8	1	4	1	0	14
PD	5	1	3	0	0	9
VD	5	1	2	2	0	10
kontrola	5	1	3	0	0	9
Celkem	38	5	23	6	0	72
Amyloid β	Řádkově relativní četnosti (v %)					Celkem
	0	0+	+	++	+++	
AN	50,0	3,3	36,7	10,0	0,0	100,0
FTD	57,1	7,1	28,6	7,1	0,0	100,0
PD	55,6	11,1	33,3	0,0	0,0	100,0
VD	50,0	10,0	20,0	20,0	0,0	100,0
kontrola	55,6	11,1	33,3	0,0	0,0	100,0
Celkem	52,8	6,9	31,9	8,3	0,0	100,0

Tabulka 42: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro NRG

NRG	Absolutní četnosti					Celkem
	0	0+	+	++	+++	
AN	6	2	12	6	4	30
FTD	4	0	6	3	1	14
PD	2	2	2	0	3	9
VD	1	3	3	2	1	10
kontrola	1	2	6	0	0	9
Celkem	14	9	29	11	9	72
NRG	Řádkově relativní četnosti (v %)					Celkem
	0	0+	+	++	+++	
AN	20,0	6,7	40,0	20,0	13,3	100,0
FTD	28,6	0,0	42,9	21,4	7,1	100,0
PD	22,2	22,2	22,2	0,0	33,3	100,0
VD	10,0	30,0	30,0	20,0	10,0	100,0

kontrola	11,1	22,2	66,7	0,0	0,0	100,0
Celkem	19,4	12,5	40,3	15,3	12,5	100,0

Tabulka 43: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro Chi3L1

Chi3L1	Absolutní četnosti					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	15	3	11	1	0	30
FTD	7	2	5	0	0	14
PD	3	0	6	0	0	9
VD	2	0	7	1	0	10
kontrola	7	1	1	0	0	9
Celkem	34	6	30	2	0	72
Chi3L1	Řádkově relativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	50,0	10,0	36,7	3,3	0,0	100,0
FTD	50,0	14,3	35,7	0,0	0,0	100,0
PD	33,3	0,0	66,7	0,0	0,0	100,0
VD	20,0	0,0	70,0	10,0	0,0	100,0
kontrola	77,8	11,1	11,1	0,0	0,0	100,0
Celkem	47,2	8,3	41,7	2,8	0,0	100,0

Tabulka 44: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro GFAP

GFAP	Absolutní četnosti					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	17	0	6	3	4	30
FTD	7	3	2	2	0	14
PD	3	1	3	0	2	9
VD	3	1	4	1	1	10
kontrola	7	1	1	0	0	9
Celkem	37	6	16	6	7	72
GFAP	Řádkově relativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	56,7	0,0	20,0	10,0	13,3	100,0
FTD	50,0	21,4	14,3	14,3	0,0	100,0
PD	33,3	11,1	33,3	0,0	22,2	100,0
VD	30,0	10,0	40,0	10,0	10,0	100,0
kontrola	77,8	11,1	11,1	0,0	0,0	100,0
Celkem	51,4	8,3	22,2	8,3	9,7	100,0

Tabulka 45: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro tau protein

Tau	Absolutní četnosti					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	2	2	15	9	2	30
FTD	4	0	8	1	1	14
PD	2	0	5	2	0	9
VD	2	0	4	4	0	10
kontrola	3	0	5	1	0	9
Celkem	13	2	37	17	3	72
Tau	Řádkově relativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	6,7	6,7	50,0	30,0	6,7	100,0
FTD	28,6	0,0	57,1	7,1	7,1	100,0
PD	22,2	0,0	55,6	22,2	0,0	100,0
VD	20,0	0,0	40,0	40,0	0,0	100,0
kontrola	33,3	0,0	55,6	11,1	0,0	100,0
Celkem	18,1	2,8	51,4	23,6	4,2	100,0

Tabulka 46: Absolutní a řádkově relativní četnosti pro VSN-1

VSN-1	Absolutní četnosti					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	12	2	8	8	0	30
FTD	5	1	6	2	0	14
PD	5	0	2	2	0	9
VD	1	1	5	3	0	10
kontrola	7	1	0	1	0	9
Celkem	30	5	21	16	0	72
VSN-1	Řádkově relativní četnosti (v %)					
	0	0+	+	++	+++	Celkem
AN	40,0	6,7	26,7	2,7	0,0	100,0
FTD	35,7	7,1	42,9	14,3	0,0	100,0
PD	55,6	0,0	22,2	22,2	0,0	100,0
VD	10,0	10,0	50,0	30,0	0,0	100,0
kontrola	77,8	11,1	0,0	11,1	0,0	100,0
Celkem	41,7	6,9	29,2	22,2	0,0	100,0