

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biochemie a patobiochemie  
Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



UNIVERZITA KARLOVA  
I. lékařská fakulta

**Mgr. Libuše Nosková**

Biomarkery neurodegenerace v séru a mozkomíšním moku u pacientů s vybranými  
neurologickými onemocněními

Biomarkers of neurodegeneration in serum and cerebrospinal fluid in patients with  
selected neurological diseases

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: MUDr. Lenka Fialová, CSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Aleš Bartoš, Ph.D.

Praha, 2022

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20.10. 2022

Mgr. Libuše Nosková

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda vyjádřila své poděkování MUDr. Lence Fialové, CSc. za odborné vedení této práce, cenné rady a vstřícný přístup. Dále děkuji konzultantu práce prof. MUDr. Aleši Bartošovi, PhD. za odborné rady.

Mé poděkování patří také laborantce Miladě Petráčkové za pomoc během experimentální činnosti a za vytvoření vstřícného a přátelského prostředí v laboratoři.

*Tato práce byla podpořena: GA UK 275015, SVV 260 523, Progres Q25/LF1 a Q35, RVO-VFN 64165.*

## **Identifikační záznam:**

NOSKOVÁ, Libuše. *Biomarkery neurodegenerace v séru a mozkomíšním moku u pacientů s vybranými neurologickými onemocněními. [Biomarkers of neurodegeneration in serum and cerebrospinal fluid in patients with selected neurological diseases]*. Praha, 2022. 88 stran, 6 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Vedoucí práce Fialová, Lenka

## Abstrakt

Neurofilamenta jsou základní strukturní komponentou cytoskeletu neuronů, kde plní řadu funkcí. Skládají se ze 3 podjednotek: lehký řetězec (NfL); střední řetězec (NfM) a těžký řetězec (NfH). Tyto podjednotky jsou ještě doplněny  $\alpha$ -internexinem v centrální nervové soustavě (CNS) nebo peripherinem v periferní NS. Vlivem různých patofyziologických procesů dochází ke zvýšenému uvolňování neurofilament do extracelulárního prostoru, kde mohou interagovat se složkami imunitního systému. Vzhledem k zapojení imunitního systému do patogeneze neurodegenerativních onemocnění a menší míře znalostí o protilátkové odpovědi na neurofilamenta, je vhodné tyto informace co nejvíce rozšířit. Stanovení volných neurofilament doplněné o analýzu protilátek proti jednotlivým podjednotkám a jejich vytvořených imunokomplexů poskytuje širší pohled na tuto problematiku. Optimalizovali jsme metody ELISA pro stanovení volných protilátek proti lehkým a těžkým řetězcům neurofilament spolu s odpovídajícími imunokomplexy pro analýzu v séru i mozkomíšním moku. Zavedení metodiky na stanovení protilátek proti lehkému a těžkému řetězci neurofilament a odpovídajících imunokomplexů je předpokladem pro analýzu uvedených parametrů v séru a mozkomíšním moku u pacientů s neurodegenerativním onemocněním. Protilátky proti těžkému řetězci neurofilament byly studovány u pacientů s Alzheimerovou chorobou. Naše výsledky neprokázaly signifikantní rozdíl v aviditě těchto protilátek mezi kontrolní skupinou a pacienty s Alzheimerovou chorobou. Analýza volných protilátek proti těžkému řetězci neurofilament spolu s odpovídajícími imunokomplexy ukázala úzké vztahy mezi oběma parametry v mozkomíšním moku a signifikantní snížení hladin obou parametrů u pacientů s mírnou kognitivní poruchou oproti kontrolní skupině kognitivně zdravých starších osob, v případě volných protilátek pak i oproti pacientům s Alzheimerovou chorobou. Stanovení protilátek proti neurofilamentům a odpovídajících imunokomplexů ve větších souborech pacientů může poskytnout informace, které doplní naše znalosti o uvolňování neurofilament i o protilátkové odpovědi proti nim.

**Klíčová slova:** neurofilamenta, protilátky, imunokomplexy, neurodegenerativní onemocnění, ELISA, sérum, mozkomíšní mok

## Abstract

Neurofilaments are the key structural component of the cytoskeleton of neurons, where they are essential for many functions. They consist of 3 subunits: light chain (NFL); medium chain (NfM) and heavy chain (NfH). Except neurofilament proteins there is also  $\alpha$ -internexin in the central nervous system (CNS) or peripherin in the peripheral NS. Due to various pathophysiological processes, neurofilament proteins are released into the extracellular space, where they can interact with the components of the immune system. While the involvement of the immune system in the pathogenesis of neurodegenerative diseases is obvious, less knowledge about the antibody response to the neurofilament proteins is available. It is eligible to expand our knowledge in this area. Determination of free antibodies against neurofilaments together with their immune complexes with corresponding antigen provides us more detailed insight into the antibody immune response against neurofilaments. We have optimized the ELISA methods to determine free antibodies against light and heavy chain of neurofilaments together with their corresponding immunocomplexes in both serum and cerebrospinal fluid. Implementation of these methods is precondition for analysis of those parameters in serum and cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative diseases. Antibodies against a heavy neurofilament chain were studied in patients with Alzheimer's disease. Our results did not show a significant difference in the avidity of these antibodies between the control group and the patients with Alzheimer's disease. Analysis of free antibodies against heavy neurofilament chain together with corresponding immunocomplexes showed close relationship between these two parameters in cerebrospinal fluid and a significant reduction in levels of both parameters in patients with mild cognitive disorder compared to the elderly cognitively normal people. Free antibodies showed also significant decrease when compared with Alzheimer's disease patients. Further analysis of antibodies against neurofilaments and their immunocomplexes in larger cohorts of patients with neurodegenerative diseases could give us a valuable additional knowledge about releasing of neurofilaments and antibody response against them.

**Key words:** neurofilament proteins, antibodies, immune complexes, neurodegenerative diseases, ELISA, serum, cerebrospinal fluid

# Obsah

|  |    |
|--|----|
| Abstrakt .....   | 5  |
| Abstract .....   | 6  |
| Seznam použitých zkratek.....  | 9  |
| 1. Úvod .....  | 11 |
| 1.1. Neurofilamenta .....  | 11 |
| 1.1.1. Struktura a funkce neurofilament .....  | 11 |
| 1.1.2. Význam stanovení neurofilament u neurologických onemocnění.....                     | 14 |
| 1.1.2.1. Alzheimerova choroba.....   | 15 |
| 1.1.2.2. Roztroušená skleróza.....   | 16 |
| 1.2. Protilátky.....   | 18 |
| 1.2.1. Autoprotilátky .....  | 20 |
| 1.2.2. Přirozeně se vyskytující protilátky (NAbs) .....                                    | 22 |
| 1.2.3. Protilátky u neurologických onemocnění .....  | 23 |
| 1.3. Imunokomplexy .....   | 25 |
| 2. Cíl práce .....   | 28 |
| 3. Materiál a metody .....   | 29 |
| 3.1. Použitý materiál a přístrojové vybavení .....   | 29 |
| 3.1.1. Přístrojové vybavení.....   | 29 |
| 3.1.2. Použitý materiál.....   | 29 |
| 3.2. Stanovení avidity protilátek proti těžkým řetězcům neurofilament (NfH).....           | 31 |
| 3.3. Stanovení imunokomplexů NfH a anti-NfH protilátek a volných anti-NfH protilátek.....  | 34 |
| 3.4. Stanovení těžkých řetězců neurofilament (NfH) .....                                   | 37 |
| 3.5. Stanovení lehkých řetězců neurofilament (NfL).....                                    | 38 |
| 3.6. Stanovení imunokomplexů lehkých řetězců neurofilament a anti-NfL protilátek           | 39 |
| 3.7. Soubory pacientů.....   | 41 |
| 3.7.1. Studie avidity anti-NfH IgG protilátek u pacientů s Alzheimerovou chorobou          | 41 |
| 3.7.2. Studie anti-NfH IgG protilátek a imunokomplexů s těžkými řetězci neurofilament..... | 42 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.8.   | Statistika.....  | 43 |
| 4.     | Výsledky .....   | 44 |
| 4.1.   | Stanovení avidity protilátek proti těžkým řetězcům neurofilament .....   | 44 |
| 4.1.1. | Optimalizace stanovení avidity anti-NfH IgG protilátek.....  | 44 |
| 4.1.2. | Hladiny a avidita anti-NfH IgG protilátek v séru u pacientů s Alzheimerovou chorobou .....                               | 47 |
| 4.2.   | Stanovení volných protilátek proti těžkým řetězcům neurofilament a odpovídajících imunokomplexů s NfH .....              | 50 |
| 4.2.1. | Optimalizace metody stanovení volných protilátek proti těžkým řetězcům neurofilament a odpovídajících imunokomplexů..... | 50 |
| 4.2.2. | Stanovení volných anti-NfH IgG protilátek a imunokomplexů u pacientů s Alzheimerovou chorobou .....                      | 54 |
| 4.3.   | Stanovení volných těžkých řetězců neurofilament.....   | 63 |
| 4.4.   | Optimalizace metody pro stanovení imunokomplexů pro lehké řetězce neurofilament.....                                     | 64 |
| 4.5.   | Stanovení volných lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku ...   | 66 |
| 5.     | Diskuse .....  | 68 |
| 6.     | Shrnutí .....  | 71 |
| 7.     | Seznam použité literatury .....  | 72 |
| 8.     | Seznam publikací .....   | 85 |
| 9.     | Seznam příloh .....  | 88 |



## Seznam použitých zkratek

|         |  |
|---------|--|
| AD      | Alzheimerova choroba   |
| Ach     | acetylcholin   |
| AI      | aviditní index   |
| ALS     | amyotrofická laterální skleróza                                |
| ANOVA   | analýza rozptylu   |
| APP     | amyloidový prekursorový protein                                |
| AU      | arbitrární jednotky koncentrace                                |
| BSA     | bovinní sérový albumin   |
| Cdk     | cyklin-dependentní kinasa                                      |
| CE-IVD  | in-vitro diagnostic medical device – certifikace dle norem EU  |
| CIS     | klinicky izolovaný syndrom                                     |
| CNS/PNS | centrální/periferní nervová soustava                           |
| Da      | dalton, jednotka molekulové hmotnosti                          |
| ELISA   | enzyme-linked immunosorbent assay                              |
| ERK     | extracellular signal-regulated kinase – fosforylující kinasa   |
| Fc      | krystalizovatelný fragment                                     |
| FTD     | frontotemporální demence                                       |
| GSK     | glycogen synthase kinase – fosforylující kinasa                |
| HRP     | křenová peroxidasa   |
| Ig      | imunoglobulin  |
| IgY     | slepičí protilátka   |
| IVIG    | intravenosní imunoglobuliny                                    |
| JNK     | c-Jun N-terminal kinase – fosforylující kinasa                 |
| M       | mol/l  |
| MAP     | mitogen-activated protein – označení kinasy                    |
| MCI     | mírná kognitivní porucha                                       |
| MMSE    | mini-mental state examination – neuropsychologické vyšetření   |
| Mr      | molekulová hmotnost  |
| MRI     | magnetic resonance imaging – zobrazovací vyšetřovací metoda    |
| Nabs    | naturally occurring autoantibodies – specifický typ protilátek |
| Nf      | neurofilamenta   |
| NK      | natural killer – typ buněk imunitního systému                  |

|       |  |
|-------|--|
| PBS   | phosphate buffered saline - pufr                               |
| PD    | Parkinsonova choroba   |
| PET   | positron emission tomography – zobrazovací vyšetřovací metoda  |
| RS    | roztroušená skleróza   |
| RT    | laboratorní teplota  |
| SIMOA | single-molecule array – vysoce citlivá metoda detekce proteinů |
| TMB   | 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin                                  |

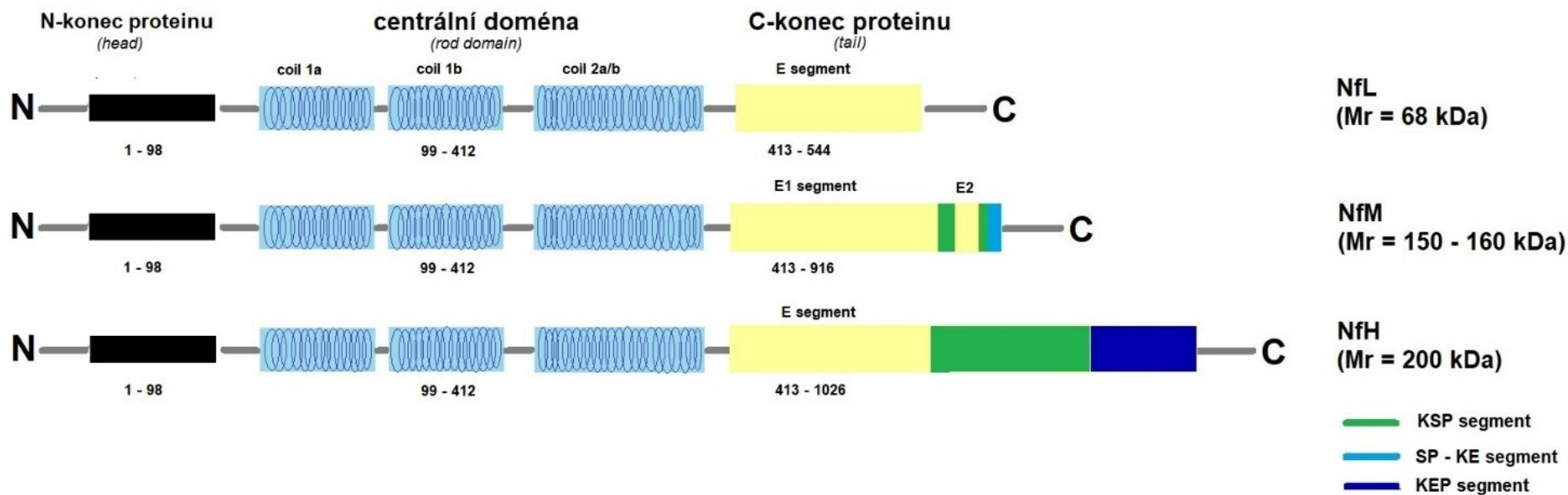
# 1. Úvod

Neurofilamenta jsou základní komponentou cytoskeletu neuronů. Jsou intenzivně studována u různých typů neurologických onemocnění, zejména neurodegenerativních, ale i traumatického poškození centrálního nervového systému (CNS). Postupně se začalo i se studiem protilátek proti neurofilamentům a objasňováním jejich významu pro patogenezi i klinické hodnocení u vybraných neurologických onemocnění. Rozšíření poznatků také o analýzu imunokomplexů neurofilament a odpovídajících protilátek je tak vhodným doplněním současných znalostí o charakteru imunitní odpovědi namířené proti této důležité neurocytoskeletální složce.

## 1.1. Neurofilamenta

### 1.1.1. Struktura a funkce neurofilament

Neurofilamenta (Nf) patří mezi IV. typ intermediálních filament a jsou nejvíce zastoupena v axonech. Tvoří heteropolymery ze 4 podjednotek – NfL (= lehký řetězec), NfM (střední řetězec), NfH (těžký řetězec) a  $\alpha$ -internexin (v CNS) nebo peripherin (především v PNS) (*Beaulieu, Robertson et al. 1999, Yuan, Rao et al. 2006, Yuan, Sasaki et al. 2012*). Vykazují klasickou strukturu intermediálních filament s „head“ doménou na N-konci proteinu, centrální („rod“) doménu s převažující helikální strukturou a C-terminální („tail“) různě dlouhou a variabilní doménou. Zjednodušená struktura neurofilament je na obrázku 1-1.

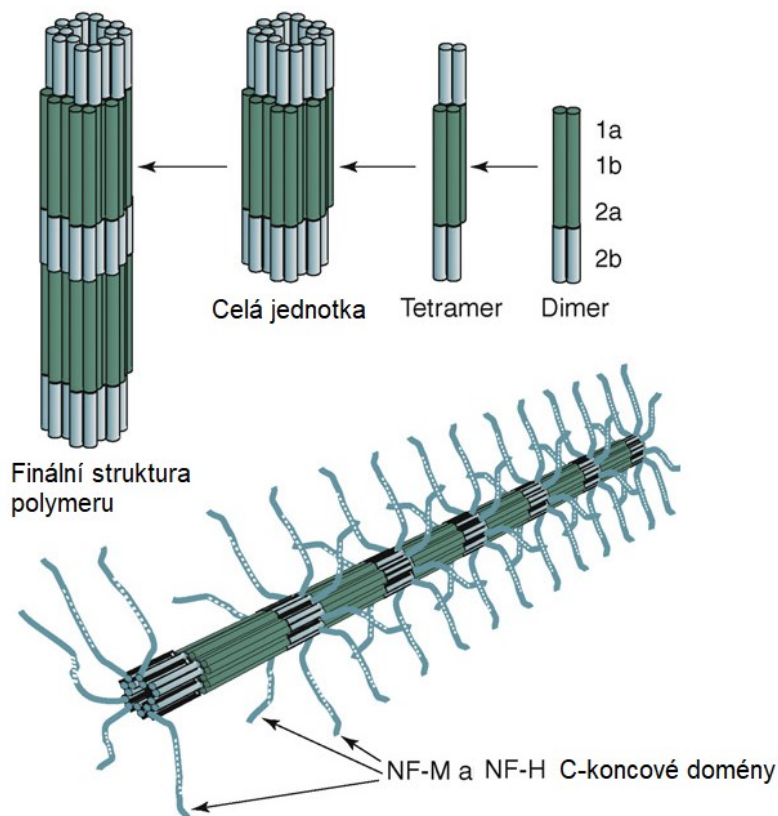


**Obrázek 1-1:** Schéma struktury neurofilamentového tripletu. Upraveno podle (Yuan, Rao et al. 2012), (Szaro and Strong 2010).

NfL – lehký řetězec z angl. light; NfM – střední řetězec z angl. Medium; NfH – těžký řetězec z angl. Heavy; Mr – molekulová hmotnost; Da – dalton, jednotka hmotnosti proteinů; E – kyselina glutamová; K – lysin; S – serin; P – prolin

Centrální doména vykazuje nejvyšší stupeň homologie. N-terminální (head) doména obsahuje variabilní počet míst post-translačních modifikací, především fosforylací a O-glykosylací (Yuan, Rao et al. 2012). C-terminální doména (tail) je nejvíce variabilní a liší se v rámci podjednotek. V případě NfM a NfH obsahuje tato doména region bohatý na aminokyseliny lysin, serin a prolin – KSP region, kde dochází k fosforylaci nejčastěji, zejména u NfH, kde může být až 50 fosforylačních míst oproti pouze několika fosforylacím na NfL (Julien and Mushynski 1983, Yuan, Rao et al. 2012). Na fosforylaci těchto regionů se podílejí zejména MAP kinasy (p38, ERK1/2, JNK), Cdk5 a GSK3 kinasy (Pant and Veeranna 1995, Veeranna, Shetty et al. 1995, Guidato, Tsai et al. 1996, Giasson and Mushynski 1997, Veeranna, Amin et al. 1998).

Neurofilamenta tvoří dlouhé válcovité polymery s průměrem 10 nm především v myelinizovaných axonech. Skládání polymeru začíná dimerizací Nf podjednotek přes centrální doménu a následnou formací tetrameru s anti-paralelní orientací až po vznik finálního polymeru – obrázek 1-2 (Cohlberg, Hajarian et al. 1995, Herrmann and Aebi 2004). Vzájemný poměr podjednotek je uváděn 4:2:1 (NfL:NfM:NfH) ještě s jednou nebo dvěma podjednotkami peripherinu resp.  $\alpha$ -internexinu (Yuan, Rao et al. 2006, Yuan, Sasaki et al. 2012).



**Obrázek 1-2:** Skládání polymerní struktury neurofilament. Převzato z (Szaro and Strong 2010).

Neurofilamenta se podílejí na organizaci a kompartmentaci struktury neuronu (perikaryon, dendrity, axon). Svojí síťovou strukturou poskytují ochranu proti opakovanému mechanickému pnutí během pohybu, na které se podílejí NfM a NfH C-koncové domény. Tyto domény mohou díky fosforylaci nést různý náboj (*Brown, Troncoso et al. 1998, Deek, Chung et al. 2016*). Neurofilamenta jsou klíčová pro radiální růst, udržování vnitřního průměru axonu a myelinizaci (*Zhu, Couillard-Despres et al. 1997, Elder, Friedrich et al. 1998, Elder, Friedrich et al. 1998*).

Byla popsána i řada mutací v jednotlivých řetězcích neurofilament u některých onemocnění jako je například Charcot-Marie-Toothova choroba, která se projevuje slabostí distálních svalů. V tomto případě jsou mutace lokalizovány na NfL, zejména na N-terminální a centrální doménu. Mutace na NfM a NfH byly nalezeny i u amyotrofické laterální sklerózy (ALS) (*Perrot and Eyer 2009, Gentil, Tibshirani et al. 2015*). Tyto mutace vedou zejména k nestabilitě neurofilamentární struktury, ke změnám ve skládání podjednotek a jejich akumulaci.

### **1.1.2. Význam stanovení neurofilament u neurologických onemocnění**

První informace o zvýšené hladině neurofilament v biologických tekutinách byly publikovány v 90. letech 20. století (*Rosengren, Karlsson et al. 1996*). Nejvíce se stanovují NfL a NfH především v likvoru a postupně s rozvojem citlivějších detekčních metod (*Kuhle, Barro et al. 2016*) se prosazuje i stanovení v séru nebo plasmě. K uvolnění neurofilament dochází i během fyziologických procesů v konstantním množství. V případě patologického procesu dochází k narušení struktury neuronů a uvolnění neurocytoskeletálních komponent, hladiny neurofilament se tak začínají zvyšovat výrazněji.

Zvýšené hladiny NfH byly prokázány u roztroušené sklerózy (RS), kde bylo možné pozorovat i korelaci s nálezy ze zobrazovacích metod (*Lycke, Karlsson et al. 1998, Teunissen, Iacobaeus et al. 2009, Kuhle, Leppert et al. 2011, Gnanapavan, Grant et al. 2013*). Přínosem se zdá být také stanovení NfH u Alzheimerovy choroby (AD) a frontotemporální demence (FTD), kde by se toto stanovení mohlo uplatnit při odlišení těchto dvou onemocnění (*Sjogren, Rosengren et al. 2000, de Jong, Jansen et al. 2007, Pijnenburg, Verwey et al. 2015*). V případě NfM byla publikována studie ohledně cévních mozkových příhod, kdy hladina NfM v likvoru byla výrazně vyšší u hemoragické cévní mozkové příhody oproti ischemické i kontrolní skupině a v séru

pak bylo prokázáno zvýšení hladiny NfM u traumatických poškození mozku (*Martinez-Morillo, Childs et al. 2015*). Nově byly nalezeny zvýšené hladiny NfM u pacientů s poruchami schizofrenního spektra (*Runge, Balla et al. 2022*).

Nejvíce studovanou podjednotkou u neurologických onemocnění jsou NfL. V likvoru bylo patrné zvýšení u většiny neurologických onemocnění oproti zdravým kontrolám (*Bridel, van Wieringen et al. 2019*), kde největší zvýšení bylo zaznamenáno u ALS a Huntigtonovy choroby. Podobně jako NfH se i NfL může uplatnit při rozlišování jednotlivých typů demencí, zejména FTD a AD a je patrná i korelace s kognitivními funkcemi při srovnání pacientů s mírnou kognitivní poruchou (MCI) a AD (*Olsson, Portelius et al. 2019*). Vzhledem k certifikaci a validaci metod je toto stanovení kandidátem pro zavedení do klinické praxe.

#### **1.1.2.1. Alzheimerova choroba**

Alzheimerova choroba patří mezi neurodegenerativní onemocnění. Je charakteristická progresivním průběhem a postihuje zejména kognitivní funkce. Popsána byla A. Alzheimerem již v roce 1907. Kromě sporadické formy se může objevit i familiární forma, která je vázaná na mutace v genu pro amyloidový prekursorový protein (APP), presenilin 1 nebo presenilin 2 (*Bateman, Aisen et al. 2011*). Za jakýsi předstupeň AD lze považovat mírnou kognitivní poruchu (MCI z angl. mild cognitive impairment), kdy jsou již měřitelné poruchy kognitivních funkcí, ale nejsou splněna diagnostická kritéria pro demenci. Klíčové jsou pro patofyziologii AD 2 proteiny – amyloid- $\beta$ , který tvoří neuritické plaky, a tau protein (a jeho fosforylovaná forma), tvořící neurofibrilární uzly (*Lane, Hardy et al. 2018*). Pro diagnostiku Alzheimerovy choroby se využívají neuropsychologické testy, zobrazovací metody (MRI – magnetic resonance imaging; PET – positron emission tomography) a biochemické markery především z mozkomíšního moku (amyloid  $\beta$ ; celkový tau protein a fosforylovaný tau protein p181-tau) (*Lane, Hardy et al. 2018*). Na zobrazovací metody a biochemické markery se zaměřuje nejnovější systém klasifikace tzv. A/T/N klasifikace (A – hodnoty biomarkeru typického pro amyloid- $\beta$ ; T – hodnoty biomarkeru typického pro tau protein; N – neurodegenerace/neuronální poškození, hodnota odpovídajícího biomarkeru) řadící 7 hlavních biomarkerů AD do zmíněných 3 kategorií, kdy hodnocení je pouze pozitivní (+) nebo negativní (-) (*Jack, Bennett et al. 2016*).

Právě do kategorie N (neurodegenerace/neuronální poškození) by mohlo být přidáno i stanovení neurofilament v nejbližší době, jak naznačují některé studie (*Khalil, Teunissen et al. 2018, Zetterberg and Blennow 2021*).

Lehké řetězce neurofilament jsou v souvislosti s AD analyzovány v mozkomíšním moku, séru a velmi často také v plasmě. Dostupné výsledky ukazují, že nejlépe funguje rozlišovací schopnost stanovení hladiny NfL mezi kontrolními skupinami a pacienty s degenerativní demencí (*Baiardi, Quadalti et al. 2022*). Tento fenomén se ukazuje i při analýze symptomatických pacientů bez strukturálního poškození CNS (*Gaiottino, Norgren et al. 2013*). Naopak při srovnání časně fáze onemocnění (MCI) a potvrzené AD je rozlišovací schopnost neurofilament spíše malá (*Zhou, Zhang et al. 2017, Bridel, van Wieringen et al. 2019*).

Těžké řetězce neurofilament mají velmi podobné charakteristiky u neurologických onemocnění jako NfL. Velmi dobře rozlišují pacienty s některým z typů demencí od kontrolních skupin a fosforylovaná forma je zvýšená u pacientů s frontotemporální demencí (*de Jong, Jansen et al. 2007, Pijnenburg, Janssen et al. 2007, Hoglund, Bogstedt et al. 2012*).

#### **1.1.2.2. Roztroušená skleróza**

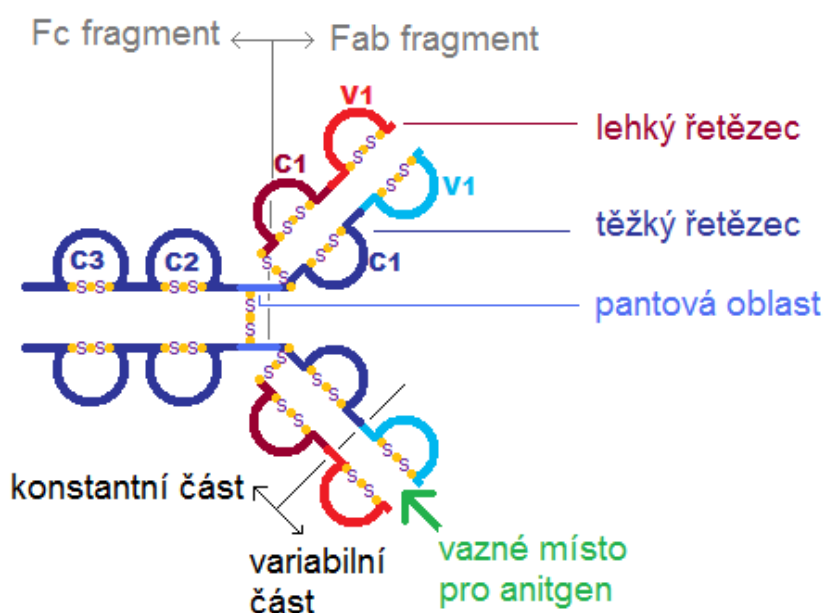
Roztroušená skleróza je chronické onemocnění CNS s výraznou autoimunitní odpovědí, kdy dochází k demyelinizaci neuronů. Jsou klasifikovány 4 fenotypy onemocnění: klinicky izolovaný syndrom (CIS) – první projev příznaků RS trvající déle než 24 hodin, ale pacient nespĺňuje diagnostická kritéria pro RS; relaps-remitentní forma (RRMS) – akutní zhoršení stavu (relaps) je následováno delším obdobím částečného či úplného zlepšení a pacient je klinicky stabilní (zhruba 80 % pacientů); sekundárně progresivní forma (SPMS) – progresivní zhoršení neurologických symptomů, vyvine se u zhruba 50 % pacientů s RRMS; primárně progresivní forma (PPMS) - progresivní zhoršování neurologických funkcí od začátku onemocnění bez významných zlepšení stavu, asi 15 % případů (*Lublin, Reingold et al. 2014*). Diagnostika je založena především na MRI sledování a vyšetření mozkomíšního moku, kde se stanovují tzv. oligoklonální pásy (porovnání protilátkového repertoáru mezi sérem a likvorem) a prokazuje se intratekální syntéza protilátek (*Dobson and Giovannoni 2019*).



V případě roztroušené sklerózy jsou hladiny neurofilament velmi intenzivně studovány. Přínos stanovení pro diagnostiku a monitoring onemocnění je prokázán řadou studií (*Hakansson, Tisell et al. 2017, Bhan, Jacobsen et al. 2018, Srpova, Uher et al. 2021, Uher, Havrdova et al. 2021*). Korelace mezi hladinou neurofilament a změnami na MRI vyšetření byla prokázána jak pro NfH (*Gnanapavan, Grant et al. 2013, Verberk, Koel-Simmelink et al. 2021*), tak i pro NfL (*Uher, Schaedelin et al. 2020, Srpova, Uher et al. 2021, Uher, Havrdova et al. 2021, Camara-Lemarroy, Metz et al. 2022*). Tyto a další studie také ukazují, že lze pomocí sledování hladiny neurofilament rozlišit jednotlivé formy RS, nejvíce se rozdílují projevují mezi CIS a RRMS (*Ljubisavljevic, Stojanovic et al. 2016, Hakansson, Tisell et al. 2017*) a při přechodu z RRMS do SPMS (*Bhan, Jacobsen et al. 2018*).

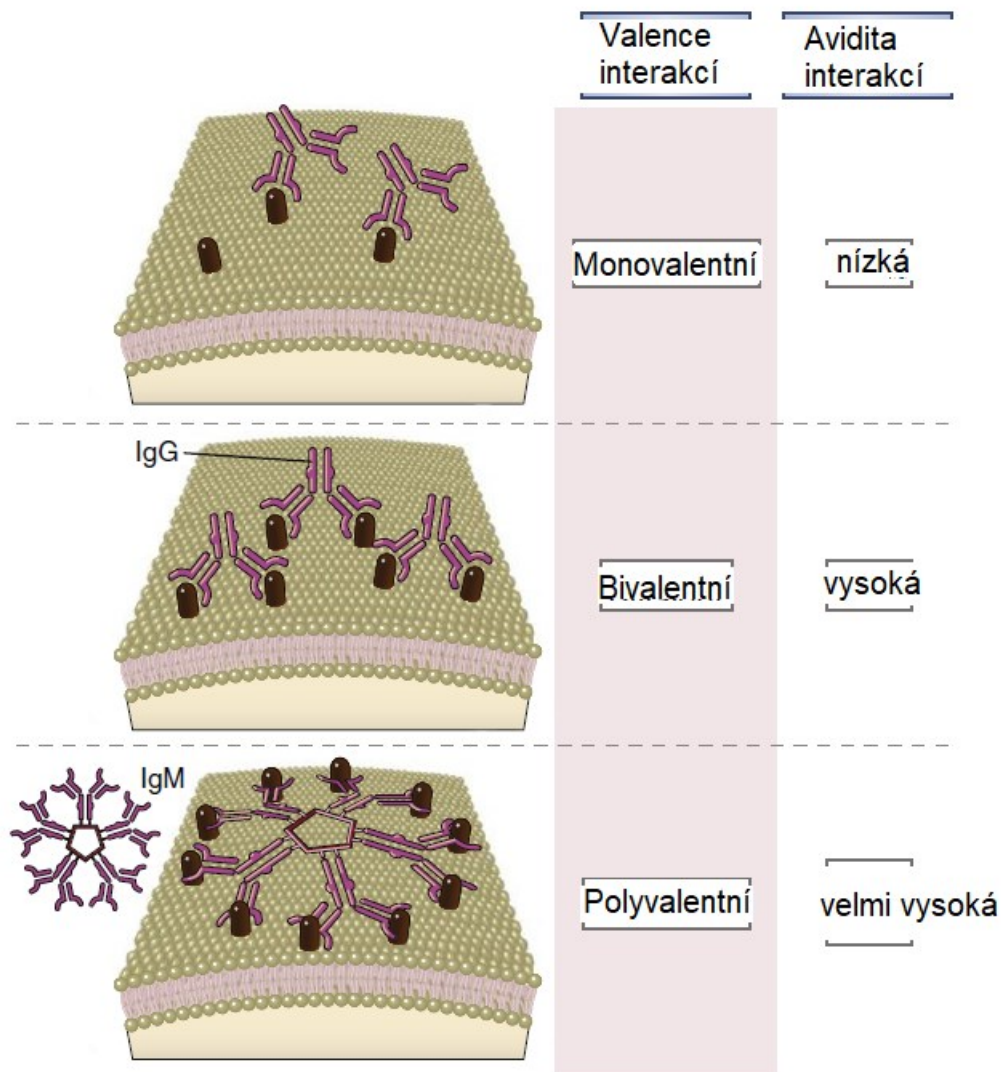
## 1.2. Protilátky

Protilátky (imunoglobuliny) jsou proteiny schopné specificky vázat konkrétní molekuly – antigeny, resp. jejich konkrétní determinantní skupiny – epitopy. Lidské protilátky jsou rozděleny podle stavby konstantní části těžkého řetězce celkem do 5 tříd: IgG, IgM, IgA, IgD a IgE. Tato práce se zaměřuje na stanovení protilátek třídy IgG. Tyto protilátky jsou nejvíce zastoupenou skupinou, koncentrace v séru je okolo 10 g/l (Abbas, Lichtman et al. 2015). Struktura protilátky třídy IgG je na obrázku 1-3.



Obrázek 1-3: Struktura IgG. Převzato z <https://www.wikiskripta.eu>

Mezi základní funkce třídy protilátek IgG patří: opsonizace, aktivace komplementu, sekundární imunitní reakce po setkání s antigenem a neutralizace toxinů. Protilátka je charakterizována svojí afinitou, což je síla vazby protilátky s epitopem, tedy míra interakce a kvantitativně je vyjádřena disociační konstantou  $K_d$ . Disociační konstanta se pohybuje v řádech  $10^{-7} - 10^{-11}$  mol/l (Abbas, Lichtman et al. 2015). Dále rozlišujeme aviditu protilátky, která vyjadřuje souhrnnou vazbu protilátky a antigenu – tedy všech epitopů daného antigenu, obrázek 1-4. Pro protilátky je klíčová jejich specifita, která je charakterizována minimální interferencí s jinými látkami – vyjadřuje se jako procento zkřížené reakce s látkou, pro jejíž stanovení není určena. Protilátky proti antigenům vlastního těla jsou nazývány autoprotilátky.



**Obrázek 1-4:** Charakteristika vazeb a avidity protilátek. Převzato z (Abbas, Lichtman et al. 2015)

Avidita protilátek se zvyšuje s každým setkáním s antigenem, odráží tak proces afinitní maturace B lymfocytů. Tato skutečnost umožňuje pomocí avidity protilátek sledovat odpověď na infekční agens a rozlišit jednotlivé fáze onemocnění zejména u virových infekcí s možnou reaktivací viru a přetrvávající hladině protilátek (Gassmann and Bauer 1997), typickým představitelem je například cytomegalovirus nebo Epstein-Barr virus. Některé studie také uvádějí možnost rozlišit podle avidity patogenní potenciál protilátky v případě nemocí zprostředkovaných imunokomplexy (Monsalvo, Batalle et al. 2011). Z praktického hlediska lze využít aviditu pro měření účinnosti očkování, kdy vyšší avidita reflektuje proces maturace B lymfocytů (Boxus, Lockman et al. 2014).

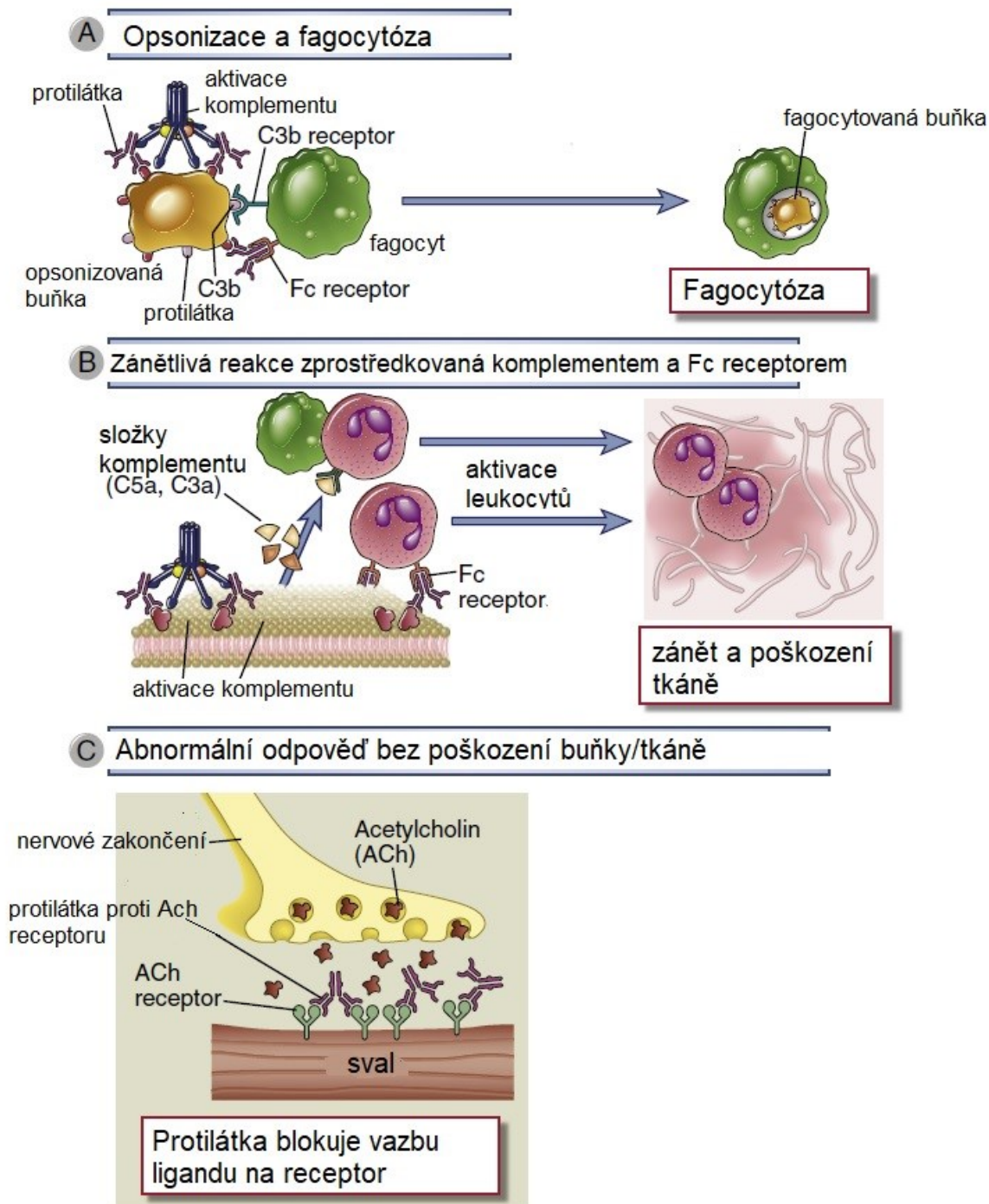
### 1.2.1. Autoprotilátky

Tvorba protilátek je součástí lidské humorální imunity jako jedna z možností imunitní odpovědi na konkrétní antigen. Obecně může mít imunitní odpověď funkci ochrannou – v případě infekčních onemocnění, nebo destruktivní – v případě autoimunitních onemocnění, případně kombinace obou případů. Role autoprotilátek u různých onemocnění je různá.

Konkrétním příkladem tvorby protilátek patologického charakteru jsou imunopatologické reakce, někdy označované jako hypersensitivní.

U imunopatologické reakce 2. a 3. typu se uplatňují i autoprotilátky.

Imunopatologické reakce 2. typu (cytotoxický typ) se vyznačují přítomností protilátek třídy IgM a IgG. Protilátky se vážou většinou na antigeny lokalizované na membráně buněk, ale není to pravidlem. Po vazbě protilátek dochází k aktivaci cytotoxických lymfocytů a zničení buňky, v některých případech dojde pouze k zablokování cílové struktury bez cytotoxického efektu. Obě třídy protilátek – IgM i IgG, mají schopnost aktivovat komplement. Mohou tak učinit přímo, kdy se aktivuje komplement a dojde k tvorbě membranolytického komplexu nebo nepřímo, přes Fc receptory fagocytů a NK buněk. V obou případech je cílová buňka zničena. Vazba protilátky na autoantigen však nemusí mít cytotoxický efekt, ale může pouze znemožnit správnou funkci buňky – například zablokováním určitého receptoru. Jako příklad lze uvést onemocnění myasthenia gravis, které postihuje kosterní svalstvo a na patogenezi se podílí protilátky proti acetylcholinergním receptorům. Ty zablokují receptor a ten je následně zničen cestou aktivace komplementu (*Gilhus, Skeie et al. 2016*). Schéma imunopatologické reakce 2. typu je znázorněno na obrázku 1-5.



**Obrázek 1-5:** Schéma imunopatologické reakce 2. typu. Převzato z (*Abbas, Lichtman et al. 2015*)

Autoprotilátky mohou sloužit jako marker onemocnění a jeho závažnosti. V případě autoimunitních onemocnění je tvorba autoprotilátek přímo součástí onemocnění (příkladem je systémový lupus erythematoses) a stanovením hladiny těchto protilátek lze sledovat aktivitu onemocnění (*Leslie, Atkinson et al. 1999*) a také odhalit onemocnění před projevením klinických příznaků, což může být klíčové

v nasazení časně terapie nebo adekvátních opatření (*Bingley, Bonifacio et al. 1997*). Stanovení specifických autoprotilátek lze také využít pro určení podstaty onemocnění průkazem imunitní odpovědi (*Reindl, Di Pauli et al. 2013, Levy, Wildemann et al. 2014*). Typicky bývají patologické protilátky namířeny proti extracelulárním epitopům buněk, kde je možnost vyvolat funkční efekt snáze než v případě intracelulárních antigenů (*Beasley and Greer 2015*). Cílem těchto protilátek tak mohou být například NMDAR (N-methyl-D-aspartát receptor) receptory (*Tsutsui, Kanbayashi et al. 2012*), iontové kanály (*Levy, Wildemann et al. 2014*) nebo gangliosidy event. další glykolipidy (*Leger, Guimaraes-Costa et al. 2015*). Další podskupinou jsou pak protilátky produkované jako T-lymfocyty zprostředkovaná odpověď na antigen, příkladem mohou být anti-Hu a anti-Yo protilátky (*Lancaster and Dalmau 2012*).

### **1.2.2. Přirozeně se vyskytující protilátky (NAbs)**

Přirozeně se vyskytující protilátky – NAbs, z angl. naturally occurring auto-antibodies, jsou tvořeny novorozenci bez vnějšího podnětu, ale za přítomnosti příslušného autoantigeny (*Hayakawa, Asano et al. 1999, Merbl, Zucker-Toledano et al. 2007*). Tyto protilátky třídy IgM a IgG jsou často namířeny proti intracelulárním antigenům a mají homeostatickou funkci – typickým příkladem je zprostředkování clearance proteinů uvolněných z nekrotických či jinak poškozených buněk (*Lutz 2007*). NAbs byly prokázány v přípravcích IVIG – z ang. intravenous immunoglobulins, které poskytují zásadní benefit při léčbě některých autoimunitních nebo zánětlivých onemocnění. V přípravcích IVIG byly prokázány také protilátky proti  $\beta$ -amyloidu (*Dodel, Du et al. 2004*) a tau proteinu (*Hromadkova, Kolarova et al. 2015*). NAbs mohou výrazně efektivněji vázat proteiny ve formě agregátů nebo fibrilárních struktur spíše než monomerní formy proteinů (*O'Nuallain, Hrnčić et al. 2006, Neff, Wei et al. 2008*), což se může uplatnit právě i u proteinů typu neurofilament.

Přehled charakteristických a navrhovaných funkcí NAbs je shrnut v tabulce 1-1.

**Tabulka 1-1:** Charakteristika a přehled možných funkcí NAb dle (Lutz, Binder et al. 2009)

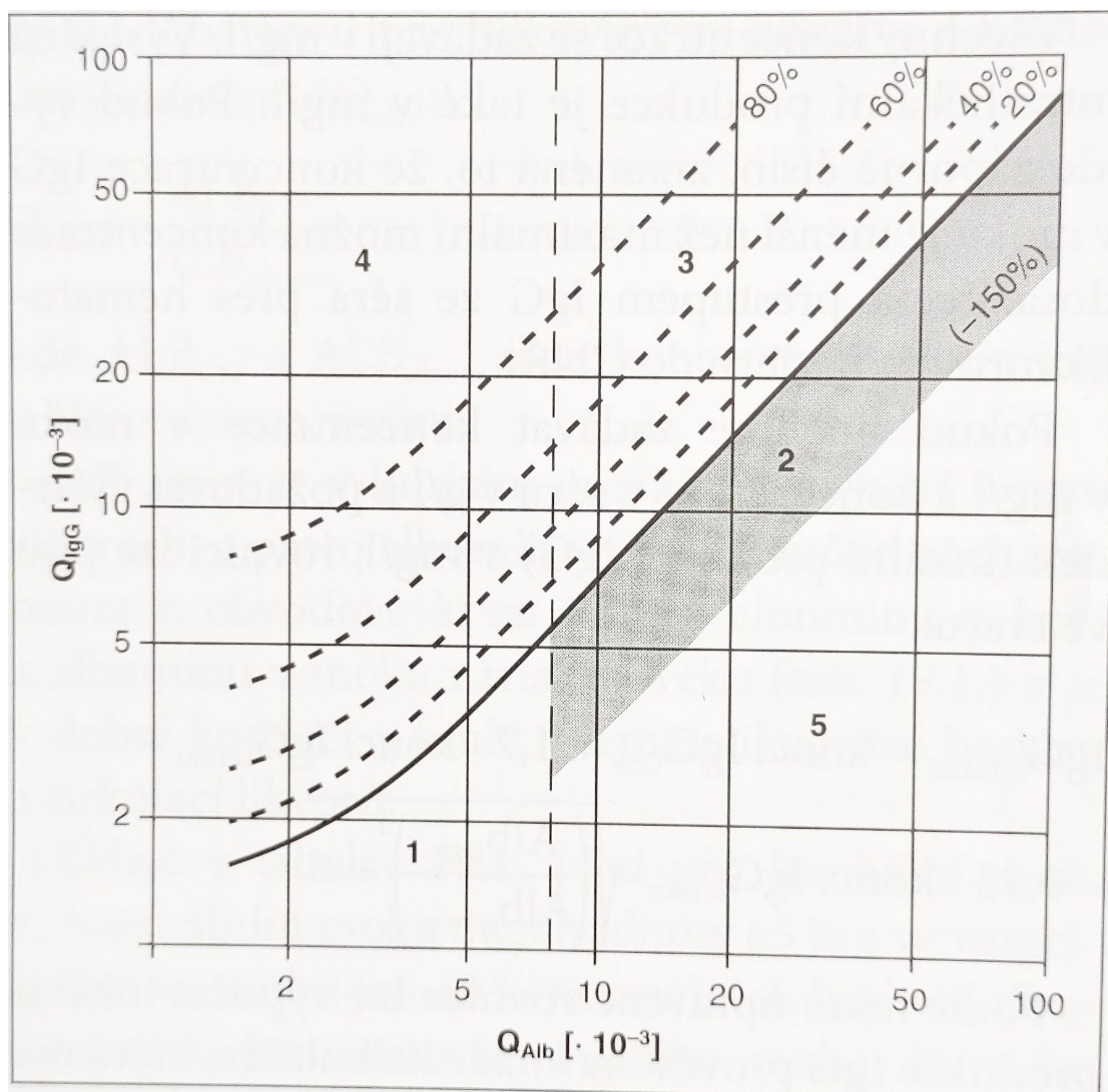
|   |
|---|
| Jsou kódovány zárodečnými V geny.   |
| U vyšších obratlovců mohou být třídy IgA, IgM a IgG.  |
| Rozpoznávají evolučně konzervované molekuly.  |
| Afinita vůči autoantigenům je $10^{-5}$ - $10^{-8}$ M.  |
| Řada z nich je polyreaktivní.   |
| Jsou vzájemně propojené a v komplexu s anti-idiotypickými IgM a IgG Nabs  |
| Participují na mechanismech clearance proteinů ze stárnoucích buněk.  |
| Opsonizují pozměněné struktury.   |
| Aktivují komplement.  |
| Pravděpodobně mají i proteolytickou funkci.   |
| Za fyziologických podmínek se uplatňují v protizánětlivé odpovědi vazbou oxidačně poškozených struktur nebo neutralizací prozánětlivých cytokinů. |
| Předpokládá se, že napomáhají funkci antigen-prezentujících buněk.  |

### 1.2.3. Protilátky u neurologických onemocnění

U neurologických onemocnění se studium protilátek uplatňuje v širokém měřítku. V rutinní klinické praxi se stanovují celkové protilátky v likvoru a prokazuje se intratekální syntéza tříd IgA, IgM a IgG. Základní metodou je stanovení albuminu a příslušného imunoglobulinu v séru a mozkomíšním moku a vynesení získaných hodnot do grafu – Reiberův diagram (obrázek 1-6). Případně lze použít pouze výpočtový vztah, tzv. IgG index podle vztahu:

$$IgG_{index} = \frac{IgG_{CSF} / IgG_{sérum}}{Alb_{CSF} / Alb_{sérum}}$$





**Obrázek 1-6:** Reiberův diagram pro hodnocení intratekální syntézy imunoglobulinů.

Převzato z (Zima 2013)

- 1 – oblast normálních hodnot; 2 – porucha hematolikvorové bariéry bez lokální syntézy IgG;
- 3 – porucha hematolikvorové bariéry spojená s intratekální syntézou IgG;
- 4 – intratekální syntéza IgG při normální funkci hematolikvorové bariéry; 5 – oblast analytické nebo pre-analytické chyby

Další možností hodnocení intratekální syntézy IgG je provedení izoelektrické fokusace likvoru a odpovídajícího vzorku séra s následnou imunochemickou detekcí oligoklonálních pásů, tato metoda se používá pro diagnostiku roztroušené sklerózy. U této metody se porovnává „obraz“, zda jsou přítomné stejné pásy v séru a v likvoru. Pro RS je typický nález pásů v likvoru, které se v séru nevyskytují. Lze také stanovovat protilátky specifické pro konkrétní diagnózy, například antiglykolipidové protilátky u vybraných typů neuropatií (Zima 2013).



V případě protilátek specifických pro některá neurodegenerativní onemocnění je zařazení mezi autoprotilátky nebo NAbS nejednoznačné, závěry studií jsou různé.

Pro diagnostiku neuromyelitis optica se využívá stanovení protilátek proti aquaporinu 4 a myelin-oligodendrocytálnímu glykoproteinu (*Lennon, Kryzer et al. 2005, Waters, McKeon et al. 2012, Reindl, Di Pauli et al. 2013*). Při diagnostice myasthenia gravis se uplatňuje stanovení protilátek proti acetylcholinovým receptorům (*Leite, Jacob et al. 2008, Koneczny, Cossins et al. 2013*).

U pacientů s Parkinsonovou chorobou (PD) jsou studovány protilátky proti  $\alpha$ -synucleinu, kdy byla prokázána specifická vazba mezi NAbS a  $\alpha$ -synucleinem (*Albus, Gold et al. 2018*) a možná inhibice intracelulárních synucleinových agregátů (*Li, Koudstaal et al. 2019*). Naproti tomu Akhtar a kol. popsali zvýšené hladiny protilátek proti  $\alpha$ -synucleinu v likvoru pacientů s PD oproti zdravým kontrolám a korelaci se snížením kognitivních funkcí (*Akhtar, Licata et al. 2018*).

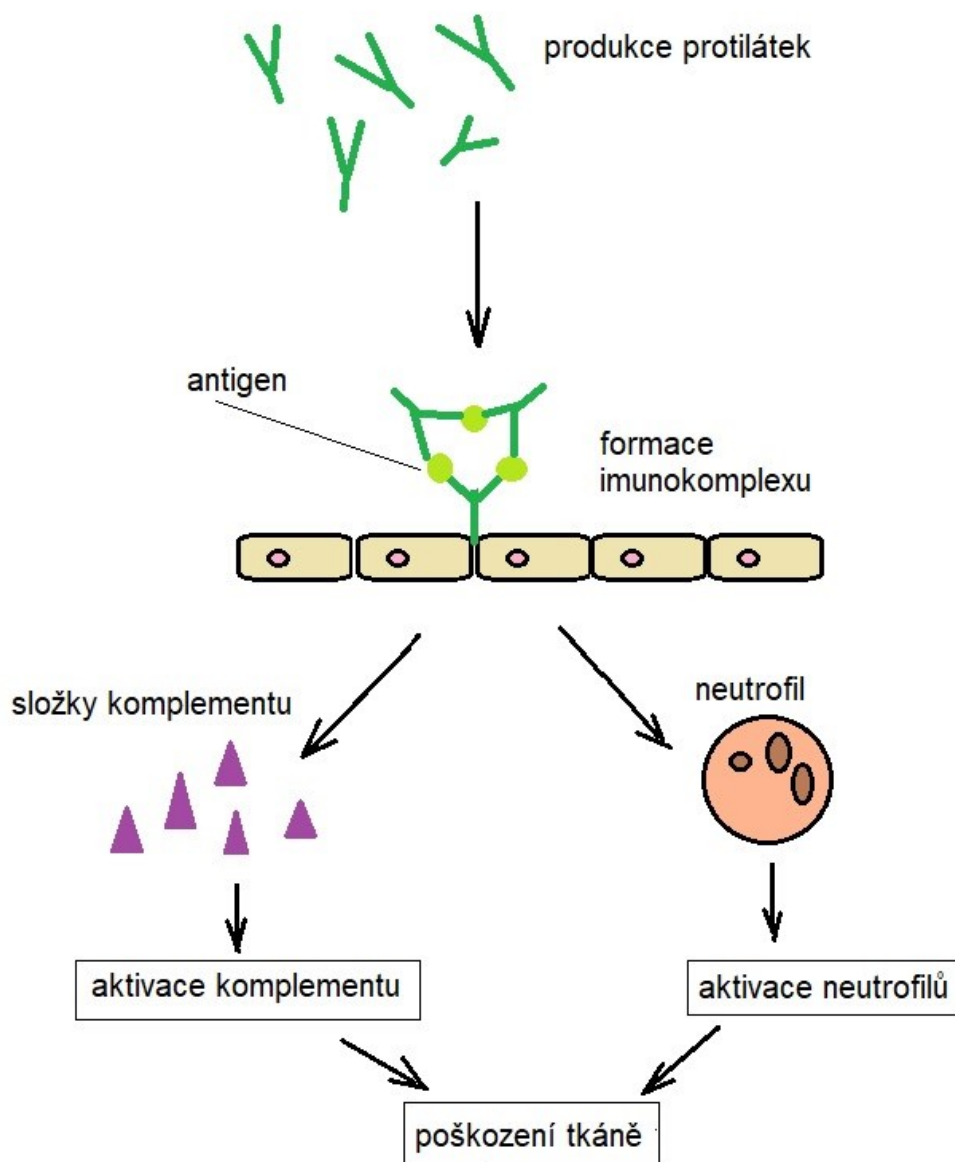
Protilátky proti tau proteinu byly prokázány v přípravcích IVIG (*Hromadkova, Kolarova et al. 2015*). U pacientů s Alzheimerovou chorobou byla popsána zvýšená intratekální syntéza anti-tau protilátek (*Bartos, Fialova et al. 2012*) a zvýšení se projevuje i u pacientů s mírnou kognitivní poruchou zejména pro fosforylovanou formu (*Klaver, Coffey et al. 2017, Krestova, Ricny et al. 2018*).

V případě protilátek proti neurofilamentům byla prokázána zvýšená intratekální syntéza anti-NfH protilátek u pacientů s Alzheimerovou chorobou (*Bartos, Fialova et al. 2012*), zvýšení anti-NfH protilátek u amyotrofické roztroušené sklerózy (*Puentes, Lombardi et al. 2021*), ale jinak o anti-NfH protilátkách není mnoho informací. U anti-NfL protilátek studie popisují zvýšené hladiny u pacientů s progresí z klinicky izolovaného syndromu (CIS) do RS a pacientů s progresivní formou RS (*Fialova, Bartos et al. 2013, Puentes, van der Star et al. 2017, Puentes, Benkert et al. 2021*).

### **1.3. Imunokomplexy**

Obecně lze říci, že pokud protilátka naváže antigen, vytvoří spolu imunokomplex. Stabilita a síla takového imunokomplexu pak závisí na konkrétním páru antigen-protilátka. I v tomto případě se může jednat o děj s patofyziologickými důsledky pro lidský organismus – imunopatologická reakce 3. typu, která je charakteristická právě tvorbou imunokomplexů. Podílí se na ní především protilátky

třídy IgG. Vzniklé imunokomplexy mohou být fagocytovány nebo ukládány do tkání (typicky ledviny). Na patologickém průběhu se podílí vazba imunokomplexu na Fc receptory a aktivace komplementu, dochází k zánětlivé odpovědi. Imunopatologická reakce 3. typu je charakterizována delší reakční dobou a nadměrným množstvím antigenu. Chronické poškození je popisováno v případě, že se jedná o protilátky proti autoantigenům – příkladem je systémový lupus erythematoses. Zjednodušené schéma imunopatologické reakce 3. typu je na obrázku 1-7.



**Obrázek 1-7:** Zjednodušené schéma imunopatologické reakce 3. typu. Upraveno podle (Abbas, Lichtman et al. 2015)

Fyziologicky však tvorba imunokomplexů představuje zejména eradikační funkci, ať už infekčního agens nebo například uvolněných intracelulárních proteinů (*Abbas, Lichtman et al. 2015*).

Stanovení imunokomplexů se v klinické praxi používá u revmatoidní artritidy nebo systémového lupusu, což jsou produkty imunopatologické reakce 3. typu. V případě těchto onemocnění se objevují i další studie, zaměřené zejména na imunokomplexy protilátek proti  $\beta$ 2-glykoproteinu u antifosfolipidového syndromu. Uplatňují se protilátky třídy IgA, IgM i IgG. Přítomnost těchto cirkulujících imunokomplexů bývá dávana do souvislosti s trombotickými stavy u pacientů s antifosfolipidovým syndromem (*Banzato, Frasson et al. 2012, Martinez-Flores, Serrano et al. 2015, Perez, Stojanovich et al. 2018*). V klinické praxi se stanovuje hladina cirkulujících imunokomplexů precipitací s polyethylenglykolem. Toto stanovení je poměrně nespecifické, determinuje pouze celkovou hladinou imunokomplexů. Zvýšené hladiny tak nacházíme kromě pacientů s revmatoidním onemocněním i u glomerulonefritid, trombocytopenické purpury nebo některých neoplazií (*Golda, Wolski et al. 2004, Perez, Stojanovich et al. 2018*).

Mimo tato stanovení je informací o imunokomplexech v biologickém materiálu minimum, nicméně se objevují studie právě se strukturními intracelulárními proteiny. Popsány byly imunokomplexy tvořené tubulinem a anti-tubulinovými protilátkami v séru, kde mírně převažovaly volné protilátky oproti imunokomplexům (*Bernier-Valentin, Rabilloud et al. 1988*). Studie zaměřená na anti-NfL protilátky a imunokomplexy sledovala mimo jiné vliv terapie na jejich hladinu, kde byly nalezeny zvýšené hladiny imunokomplexů po podání natalizumabu (*Puentes, Benkert et al. 2021*). Hladiny imunokomplexů s NfL se jeví jako pomocné stanovení i u pacientů s ALS, u nichž dobře rozlišovalo mezi kontrolní skupinou a pacienty (*Puentes, Lombardi et al. 2021*). Popsány byly i výrazně zvýšené hladiny protilátek proti  $\beta$ -amyloidu vázané v imunokomplexech u pacientů s AD (*Maftei, Thurm et al. 2012, Maftei, Thurm et al. 2013*).

Studium hladin protilátek proti neurocytoskeletálním proteinům a příslušných imunokomplexů je žádoucí dále rozšiřovat pro získání přesnějších informací o chování příslušných protilátek.

## 2. Cíl práce

Tato práce se zaměřila především na stanovení protilátek proti neurofilamentům a jejich imunokomplexů s odpovídajícím antigenem u vybraných neurologických onemocnění. Součástí je i stanovení volných neurofilament v mozkomíšním moku.

Cíle je možné rozdělit do dvou částí – metodické a klinické:

- 1) Cílem metodické části práce byla optimalizace ELISA metod:
  - a. pro stanovení avidity protilátek proti NfH, kde byla testována zejména různá chaotropní činidla
  - b. pro paralelní stanovení volných anti-NfH protilátek a jejich imunokomplexů s NfH v séru a mozkomíšním moku.
  - c. pro paralelní stanovení volných anti-NfL protilátek a jejich imunokomplexů s NfL v séru a mozkomíšním moku
  
- 2) Cílem klinické části práce bylo stanovit protilátky proti NfH, jejich aviditu a jejich imunokomplexy s NfH u pacientů s Alzheimerovou chorobou.

*Hypotézy:*

- *Hladiny volných anti-NfH protilátek a jejich imunokomplexů korelují navzájem v séru nebo mozkomíšním moku*
- *Hladiny volných anti-NfH protilátek nebo jejich imunokomplexů v séru korelují s volnými anti-NfH protilátkami nebo jejich imunokomplexy v likvoru.*
- *Avidita a hladina IgG protilátek proti NfH spolu korelují.*
- *Volné anti-NfH protilátky, jejich avidita a jejich imunokomplexy jsou zvýšené u pacientů s Alzheimerovou chorobou a mírnou kognitivní poruchou v porovnání s kontrolní skupinou.*

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Použitý materiál a přístrojové vybavení

##### 3.1.1. Přístrojové vybavení

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| Analytické váhy SI-234                                 | Denver Instruments, USA     |
| Centrifuga CD 1008                                     | Phoenix Instrument, Německo |
| ELISA reader Tecan Sunrise<br>s programem Magellan v.6 | Tecan, Švýcarsko            |
| Odsávačka / aspirátor FTA-1                            | Biosan, Litva               |
| Orbitální temperovaná třepačka PST-60HL                | Biosan, Litva               |
| Orbitální temperovaná třepačka MB-102                  | Bioer, Čína                 |
| pH metr  | Denver Instruments, USA     |
| Předvážky  | Kern, Německo               |
| Vortex V1 plus   | Biosan, Litva               |
| Vortex Genie 2   | Scientific Industries, USA  |

##### 3.1.2. Použitý materiál

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| 15 a 50 ml plastové zkumavky  | Corning, USA                        |
|   | Neptune Scientific, USA             |
| Azid sodný  | Fluka, Německo                      |
| BSA fraction V  | Sigma-Aldrich (Merck), Německo      |
| BSA fraction V IgG free   | Rockland, USA                       |
| Calibrator 1 for Immunochemistry systems                            | Beckman Coulter, ČR                 |
| ELISA stripy Nunc MaxiSorp  | Thermo Fisher Scientific, Dánsko    |
| HCl   | VWR International, USA              |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                      | Penta, ČR                           |
| Kiovig  | Baxter (Takeda Pharmaceuticals), ČR |
| NaOH  | Penta, ČR                           |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Penta, ČR                           |

|   |  |
|---|--|
| NaHCO <sub>3</sub>  | Penta, ČR                                |
| NaCl, KCl   | Penta, ČR                                |
| Nitrilové rukavice jednorázové  | VWR International, USA                   |
| Latexové rukavice jednorázové   | VWR International, USA                   |
| Pipety Eppendorf Research Plus<br>s volitelným rozsahem                         | Eppendorf, Německo                       |
| Špičky k automatickým pipetám   | Vertex SSIbio, USA<br>Eppendorf, Německo |
| Jednorázové plastové mikrozkušavky  | SSIbio, USA                              |
| Skleněné vialky s mikro-insertem  | Verkon, ČR<br>VWR International, USA     |
| Ethanol denaturovaný  | Penta, ČR                                |
| ELISA kit NfL, CE-IVD   | UmanDiagnostics, Švédsko                 |
| ELISA kit NfH (MBS762268)   | MyBioSource, USA                         |
| Desam OX  | Schulke, Německo                         |
| Kohrsolin   | Hartmann Rico, ČR                        |
| Tween 20  | Carl Roth, Německo                       |
| Skim milk powder  | Sigma-Aldrich (Merck), Německo           |
| Bovine NfL from spinal cord   | Progen, Německo                          |
| Bovine NfH from spinal cord   | Progen, Německo                          |
| Protilátka proti NfL (anti-NEFL)  | Sigma-Aldrich (Merck), Německo           |
| Protilátka proti NfL UD1  | UmanDiagnostics, Švédsko                 |
| Protilátka proti NfH (anti-NEFH)  | Sigma-Aldrich (Merck), Německo           |
| Sekundární protilátka proti lidskému Fc IgG<br>konjugovaná s peroxidasou (goat) | Southern Biotech, USA                    |
| Sekundární protilátka IgY proti lidskému IgG<br>konjugovaná s peroxidasou       | Sigma-Aldrich (Merck), Německo           |
| TruBlock 3  | Meridian LifeScience, USA                |
| TMB Complete Solution   | TestLine, ČR                             |

### 3.2. Stanovení avidity protilátek proti těžkým řetězcům neurofilament (NfH)

Základní metodou této práce je ELISA z anglického „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ v různých modifikacích dle typu stanovení. Tato imunochemická metoda je založena na interakci antigenu a příslušných protilátek, kdy k detekci je použita enzymem katalyzovaná přeměna chromogenního substrátu.

#### **Použité roztoky:**

PBS pufr („Phosphate Buffered Saline“): pH 7,4

*NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (10 mM)*

Vazebný uhličitanový pufr: pH 9,6

*NaHCO<sub>3</sub> (10 mmol/l), NaN<sub>3</sub> (0,15 mmol)*

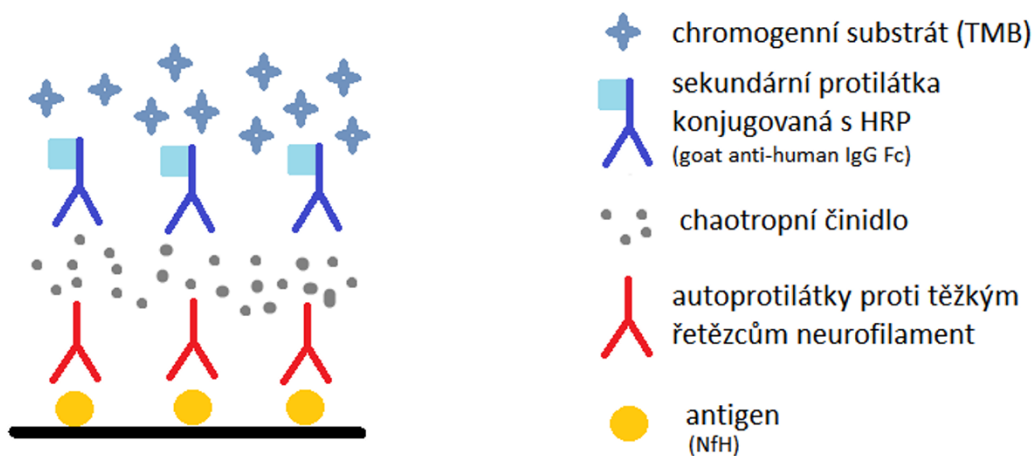
#### Blokovací / ředicí roztok:

*1 % (w/V) BSA fraction V v PBS*

#### Promývací roztok:

*NaCl (0,1 mol/l), Tween 20 (0,25 % w/V)*

Schéma metody ELISA pro stanovení avidity protilátek třídy IgG proti těžkým řetězcům neurofilament NfH (anti-NfH IgG) je uvedeno na obrázku 3-1.



**Obrázek 3-1:** Schéma metody ELISA pro stanovení avidity anti-NfH IgG protilátek

Námi používaná metoda vychází z dříve publikovaných prací (*Silber, Semra et al. 2002, Bartos, Fialova et al. 2007, Fialova, Svarcova et al. 2012*) Pro stanovení protilátek je prvním krokem navázání antigenu – zde NfH, na povrch jamek destičky. Byly používány destičky (stripy) Nunc s povrchem MaxiSorp.

Jako antigen byla použita neurofilamenta izolovaná z bovinní míchy (čistota udávaná výrobcem > 98 %) naředěná na koncentraci 2,5 µg/ml ve vazebném uhličitanovém pufru. Nanášeno bylo 100 µl/jamka a deska byla následně zakryta adhezivní folií a víčkem a inkubována přes noc při teplotě 4 °C, část jamek byla ponechána bez antigenu, nanesen byl pouze vazebný pufr. Po navázání antigenu byly všechny jamky promyty – 3x 200 µl promývacího roztoku. Následně byla zablokována neobsazená vazebná místa desky pomocí blokovacího roztoku – 150 µl/jamka, inkubace 1h za laboratorní teploty (RT z angl. „room temperature“). Následně byly nanесeny vzorky séra a kalibračních roztoků (vždy v doubletu) – 100 µl/jamka a inkubovány 2h při RT. V průběhu optimalizace metody bylo testováno ředění séra v rozmezí 1:50 – 1:400, vzorky byly ředěny pomocí ředicího roztoku (1 % BSA fr. V v PBS). Po skončení inkubace byly jamky promyty 5x promývacím roztokem viz výše a následoval krok s přidavkem chaotropního činidla. Chaotropní činidla o testovaných koncentracích, případně pouze PBS, byla nanесena na příslušné jamky v množství 100 µl a doba působení byla 10 min při RT. Následoval promývací krok – 4x 200 µl.



Následným krokem bylo nanesení sekundární protilátky (konjugátu) proti Fc regionu lidských IgG konjugované s peroxidasou ředěné 5000x ředícím roztokem v množství 100 µl/jamka, inkubace 1h, RT. Po promytí (4x) bylo nanášeno 100 µl/jamka substrátu pro peroxidasu – 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TMB complete solution, TestLine). Enzymová reakce peroxidasy se substrátem byla zastavena po 15–25 minutách inkubace v temnu přidávkem 2 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 µl/jamka. Následně byla změřena absorbance (A) jednotlivých jamek při 450 nm oproti referenční vlnové délce 620 nm na ELISA readeru Tecan Sunrise s programem Magellan v6.

Absorbance slepého vzorku (sérum bylo nahrazeno ředícím roztokem) byla odečtena ode všech hodnot. Měření bylo dále doplněno na každé desce stejným vzorkem interní kontroly („pooled serum sample“). Intra- a inter-assay parametry ELISA metody nepřekročily 10 %.

- **Chaotropní činidla**

Chaotropní činidla slouží k porušení slabých vazebných interakcí mezi protilátkou a antigenem a umožňují tak rozlišit protilátky s vysokou / nízkou aviditou. V návaznosti na dříve publikované práce (*Cucnik, Bozic et al. 2005, Fialova, Svarcova et al. 2012*) byly z možných chaotropních činidel testovány dvě – urea v koncentracích 2, 4, 6 a 8 mol/l a NaCl v koncentracích 0,25 mol/l; 0,5; 1; 2 a 3 mol/l.

- **Vyjádření koncentrace anti-NfH IgG protilátek**

Pro stanovení anti-NfH IgG protilátek není dostupný žádný komerční nebo jinak definovaný standard, proto byl jako kalibrační standard použit vzorek směsného séra připravený ze sér se stanovenou vyšší hladinou anti-NfH IgG protilátek. Z tohoto kalibračního standardu byla geometrickým ředěním v rozsahu 1:50 - 1:400 sestavena kalibrační křivka pro každou desku a byly tak odvozeny arbitrární jednotky koncentrace (AU) anti-NfH IgG protilátek. Kalibrační křivky byly vytvořeny v programu Magellan.

Jako slepý vzorek byla měřena jamka potažená NfH, kde vzorek séra nebo likvoru byl nahrazen pouze ředícím roztokem. Hodnota absorbance slepého vzorku byla odečtena ode všech ostatních hodnot.

- **Vyjádření avidity anti-NfH IgG protilátek**

Avidita protilátek se obvykle vyjadřuje jako aviditní index (AI), který je definován jako poměr absorbance nebo koncentrace (v AU) vztahem:

$$AI = \frac{\text{absorbance (nebo AU) jamky s chaotropním činidlem}}{\text{absorbance (nebo AU) jamky bez chaotropního činidla}}$$

Aviditní index se obvykle vyjadřuje v procentech. Jako vysoko aviditní protilátky jsou klasifikovány ty s hodnotou AI > 60 % a jako nízko aviditní s hodnotou AI < 40 %. Rozmezí AI 40 – 60 % je označováno jako šedá zóna, kde není možné o aviditě protilátek jednoznačně rozhodnout (*Almanzar, Ottensmeier et al. 2013*).

### **3.3. Stanovení imunokomplexů NfH a anti-NfH protilátek a volných anti-NfH protilátek**

Modifikace ELISA metod pro stanovení imunokomplexů NfH a anti-NfH IgG protilátek vycházejí kromě výše popsaných prací také z prací publikovaných Maftai et. al. (*Maftai, Thurm et al. 2012, Maftai, Thurm et al. 2013*). Pro paralelní stanovení volných protilátek a protilátek vázaných v imunokomplexech byly oba postupy co nejvíce unifikovány.

#### **Použité roztoky:**

PBS pufr („Phosphate Buffered Saline“): pH 7,4

*NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (10 mM)*

Vazebný uhličitanový pufr: pH 9,6

*NaHCO<sub>3</sub> (10 mmol/l), NaN<sub>3</sub> (0,15 mmol)*

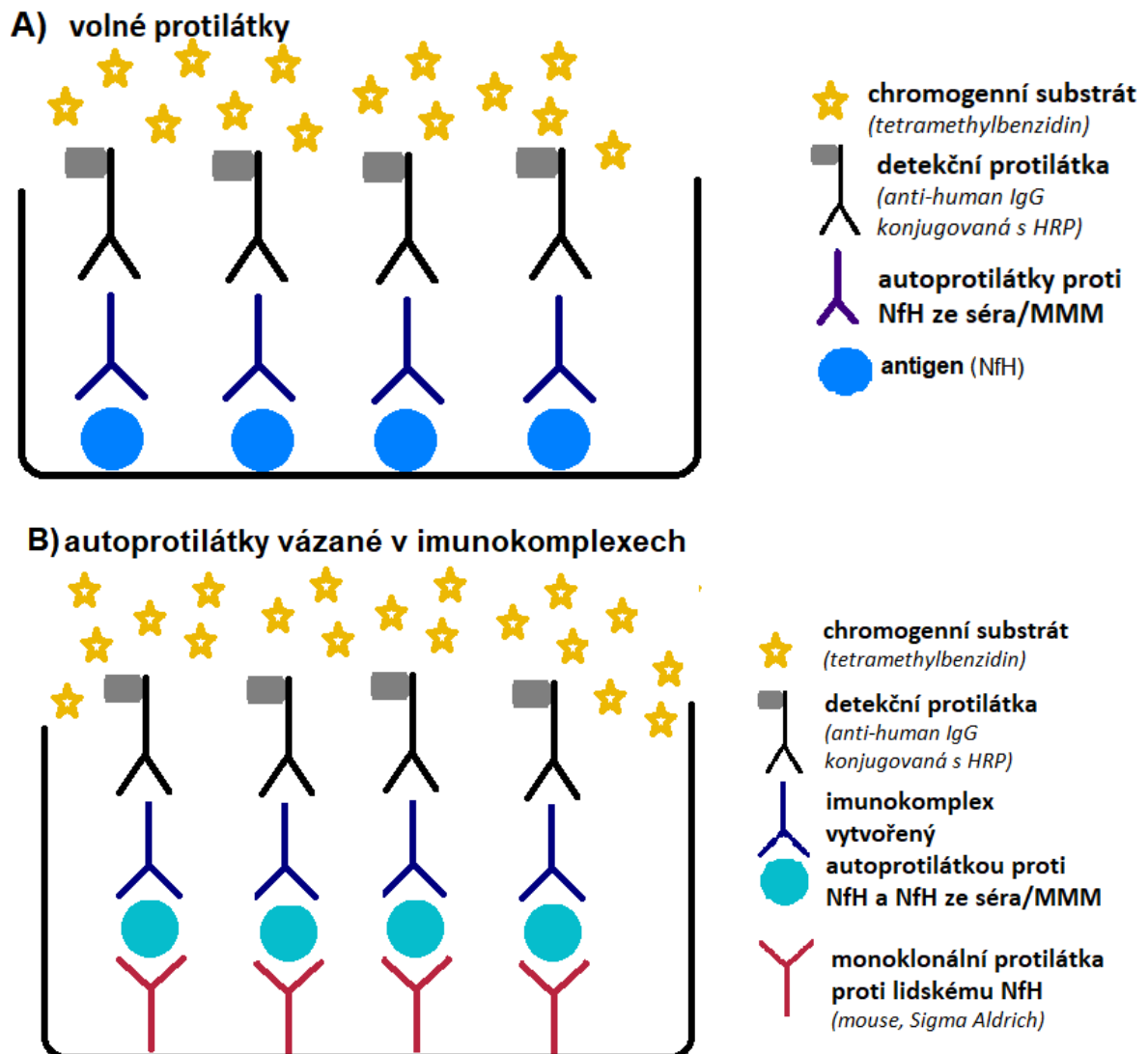
#### Blokovací / ředící roztok:

1 % (w/V) roztok sušeného mléka (Skim milk powder, Sigma Aldrich) v PBS

#### Promývací roztok:

0,05 % (V/V) Tween 20 v PBS pH 7,4

Základní schéma obou metod je shrnuto na obrázku 3-2.



**Obrázek 3-2:** Schéma metody ELISA pro stanovení volných anti-NfH IgG protilátek (A) a imunokomplexů NfH a anti-NfH IgG protilátek (B)

Použity byly destičky Nunc s povrchem Maxisorp. Jako antigen pro stanovení volných protilátek byla opět použita neurofilamenta izolovaná z bovinní míchy naředěná na koncentraci 2,5  $\mu\text{g/ml}$  ve vazebném uhličitanovém pufru. Jamky destičky pro stanovení imunokomplexů NfH a anti-NfH IgG protilátek byly potaženy monoklonální protilátkou proti těžkým řetězcům neurofilament (*anti-NEFH, produced in mouse, klon 2E8, Sigma Aldrich*) naředěnou na koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$  v PBS pufru. Nanášeno bylo 100  $\mu\text{l}$ /jamka a deska byla následně zakryta adhezivní folií a víčkem a inkubována přes noc při teplotě 4  $^{\circ}\text{C}$ , část jamek byla ponechána

bez specifického potahu (antigen/protilátka), nanesen byl pouze pufr. Po navázání jednotlivých komponent byly desky inkubovány 30 minut za laboratorní teploty a následně promyty 4x 200  $\mu$ l/jamka promývacím roztokem. V dalším kroku byly jamky zablokovány blokovacím roztokem – 150  $\mu$ l/ jamka, 1h, RT a po skončení blokování jednou promyty – 200  $\mu$ l/jamka promývacím roztokem. Následně byly nanesený jednotlivé vzorky a kalibrační roztoky 100  $\mu$ l/jamka – sérum bylo ředěno 100x ředicím roztokem a mozkomíšní mok byl ponechán neředěný. Vzorky séra byly analyzovány v tripletu, likvor pouze v doubletu kvůli dostupnosti materiálu. Inkubace probíhala 2h za laboratorní teploty. Následovalo promytí 5x 200  $\mu$ l/jamka a nanesení sekundární protilátky – konjugátu. Použita byla slepičí protilátka proti lidským IgG konjugovaná s peroxidasou – IgY-HRP (anti-human IgG H+L Peroxidase antibody produced in chicken, Sigma Aldrich) ředěná 10 000x ředicím roztokem, 100  $\mu$ l/jamka, inkubace 1h za laboratorní teploty. Po promytí 4x 200  $\mu$ l/jamka byl nanesen substrát TMB v množství 100  $\mu$ l/jamka. Po 15minutové inkubaci v temnu byla peroxidasová reakce zastavena přidáním roztoku 2 mol/l  $H_2SO_4$  v množství 100  $\mu$ l/jamka. Následně byla změřena absorbance (A) jednotlivých jamek při 450 nm oproti referenční vlnové délce 620 nm na ELISA readeru Tecan Sunrise s programem Magellan v6.

- **Vyjádření koncentrace anti-NfH IgG protilátek / imunokomplexů**

Podobně jako pro vyjádření koncentrace volných protilátek, tak i pro vyjádření koncentrace příslušných imunokomplexů není dostupný jednotný standard. Oproti předchozí metodě byl využit komerční kalibrační roztok – Immunochemistry systems Calibrator 1 od formy Beckman Coulter, který je využíván například s automatickými analyzátory Immage pro stanovení celkových IgG v séru a likvoru. Tento kalibrační roztok byl ředěn 10 – 1250x a ze získaných hodnot byla sestavena kalibrační křivka pro každou desku a koncentrace volných anti-NfH IgG protilátek a odpovídajících imunokomplexů je tak vyjádřena v arbitrárních jednotkách koncentrace AU. Kalibrační křivky byly vytvořeny v programu Magellan v6, použito bylo nelineární proložení, spolehlivost > 95%. Tento kalibrační roztok ředěný 100x byl využit také jako vnitřní kontrola pro každé stanovení.

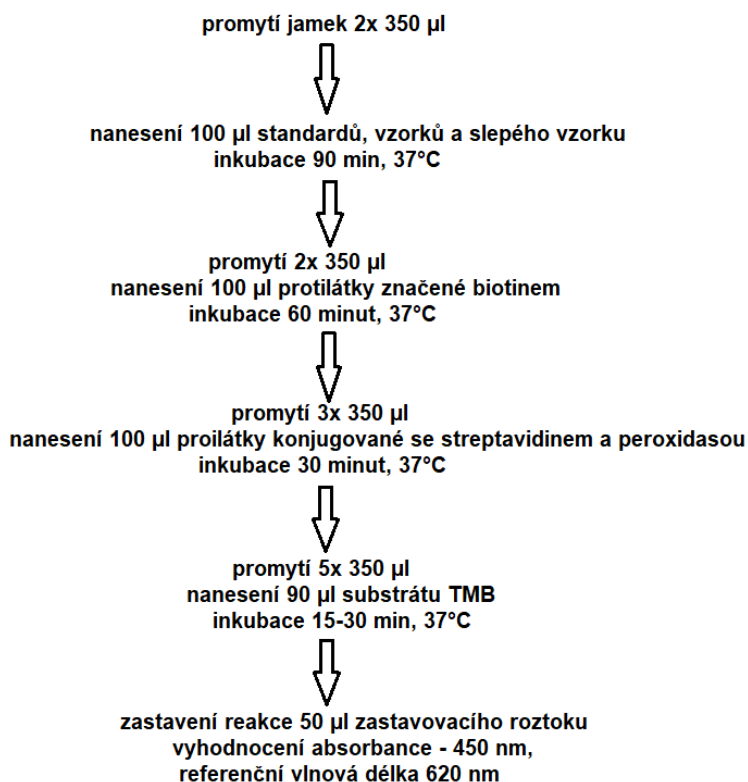
Jako slepý vzorek byla měřena jamka potažená NfH / anti-NEFH protilátkou, kde vzorek séra nebo likvoru byl nahrazen pouze ředícím roztokem. Hodnota absorbance slepého vzorku byla odečtena ode všech ostatních hodnot.

V klinické praxi se používá i tzv. imunoglobulinový index Q, který vyjadřuje vztah mezi hladinou protilátek v séru a mozkomíšním moku a počítá se dle následujícího vztahu:

$$Q = \frac{\text{koncentrace IgG v likvoru}}{\text{koncentrace IgG v séru}}$$

### 3.4. Stanovení těžkých řetězců neurofilament (NfH)

Pro stanovení těžkých řetězců neurofilament jsou dostupné komerční ELISA kity. Pro tuto práci byly primárně vybírány soupravy pro stanovení celkových NfH, nikoli pouze fosforylovaných NfH, pro které je často využívána souprava firmy BioVendor. V práci byl použit kit dodávaný společností MyBio Source – kat.č. MBS762268 a postupováno bylo přesně podle návodu výrobce, složení jednotlivých roztoků v kitu není uváděno. Vzorky likvoru byly ředěny 1:2 (ev. 1:4 v případě vyšší koncentrace NfH). Postup je zjednodušeně uveden v obrázku 3-3.



Obrázek 3-3: Zkrácené schéma metody pro stanovení NfH

### 3.5. Stanovení lehkých řetězců neurofilament (NfL)

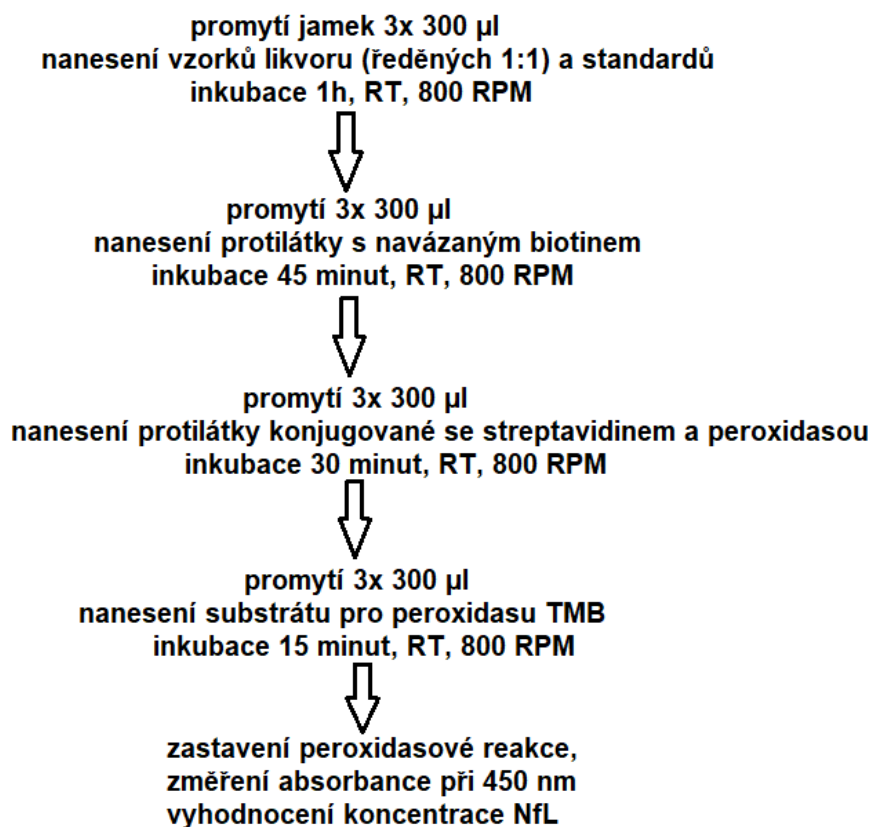
Pro stanovení lehkých řetězců neurofilament NfL je dostupný ELISA kit od firmy Uman Diagnostics, který byl využíván i v této práci. Tento kit má CE-IVD certifikaci a je využíván pro stanovení koncentrace NfL v likvoru. Stanovení bylo provedeno podle aktuálně platného návodu, který je součástí kitu. I toto stanovení využívá bovinní NfL (zde jako standard). K vytvoření kalibrační křivky se používá 4-parametrové proložení a koncentrace NfL je uváděna v pg/ ml. Postup metody je shrnut v obrázku 3-4.

Stanovení koncentrace NfL v séru vyžaduje citlivější metody vzhledem k nižší koncentraci NfL v séru. Možnosti stanovení v séru a další analytické aspekty jsou shrnuty v publikaci (*Fialová, Nosková et al. 2022*).

Orientační referenční rozmezí udávané výrobcem je shrnuto v tabulce 3-1.

**Tabulka 3-1:** Referenční rozmezí pro koncentraci NfL v likvoru.

| věk          | referenční rozmezí |
|--------------|--------------------|
| < 30 let     | < 290 pg/mL (n=17) |
| 30 – 39 let  | < 380 pg/mL (n=15) |
| 40 - <60 let | < 830 pg/mL (n=18) |



**Obrázek 3-4:** Zkrácený postup pro stanovení NfL v likvoru

### **3.6. Stanovení imunokomplexů lehkých řetězců neurofilament a anti-NfL protilátek**

Metody pro stanovení anti-NfL IgG protilátek a imunokomplexů NfL-antiNfL IgG jsou analogické metodám pro stanovení NfH imunokomplexů a protilátek popsanych v kapitole 3.3.

#### **Použité roztoky:**

PBS pufr („Phosphate Buffered Saline“): pH 7,4

*NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (10 mM)*

#### Blokovací roztok:

1 % (w/V) roztok sušeného mléka (Skim milk powder, Sigma Aldrich) v PBS

#### Ředící roztok:

1 % (w/V) roztok sušeného mléka (Skim milk powder, Sigma Aldrich) v PBS

10 µg/ml TruBlock

#### Promývací roztok:

0,05 % (V/V) Tween 20 v PBS pH 7,4

Pilotní experimenty byly provedeny s protilátkou anti-NEFL (*Sigma Aldrich*), ale protože zavedený CE-IVD ELISA kit pro stanovení NfL využívá jiný typ protilátky, byla metoda dále optimalizována již s použitím protilátky proti NfL od UmanDiagnostics značená výrobcem jako UD1 (anti-NfL mAb 47:3). Tato protilátka je používána jak v ELISA kitu stejného výrobce, tak i v metodě pro stanovení NfL v séru pomocí SIMOA (z angl. Single-Molecule Array).

K potlačení nespecifické vazby interferujících heterofilních látek, které mohou být obsaženy i v lidském séru, byl do ředícího roztoku pro vzorky a sekundární protilátku (konjugát) přidán TruBlock™ 3, což je specifický blokátor nespecifických interferencí v imunochemických metodách.

Jamky byly potaženy NfL o koncentraci 5 µg/ml nebo protilátkou UD1 o koncentraci 1,5 µg/ml v PBS pufru vždy v množství 100 µl/jamka. Následovala inkubace přes noc jak je popsáno v kap. 3.3 stejně jako další následující kroky. Vzorky séra byly ředěny 50x v ředícím roztoku s přídatkem TruBlock a likvor byl nanášen opět neředěný. Veškeré promývací kroky a inkubační časy byly stejné jako v kap. 3.3. Sekundární protilátka (konjugát) proti lidským IgG konjugovaná s peroxidasou – IgY-HRP byla ředěna 5 000x.

- **Vyjádření koncentrace anti-NfL IgG protilátek / imunokomplexů**

Oproti metodě popsané v kap. 3.3 byla jako kalibrační roztok pro vyjádření hladin imunokomplexů a protilátek použita směs Calibratoru 1 od firmy Beckman Coulter a intravenosního imunoglobulinového roztoku KIOVIG v poměru 1:1. Takto připravený směsný „kalibrátor“ byl dále ředěn 10-1250x pro vytvoření příslušné kalibrační křivky



a následnému vyjádření koncentrace anti-NfL IgG protilátek a imunokomplexů v arbitrárních jednotkách. Jako slepý vzorek byla opět měřena jamka potažená NfL / UD1 protilátkou, kde vzorek séra nebo likvoru byl nahrazen pouze ředicím roztokem. Hodnota absorbance slepého vzorku byla odečtena ode všech ostatních hodnot.

### **3.7. Soubory pacientů**

Vzorky pro stanovení jednotlivých parametrů byly získány od pacientů s různými neurologickými onemocněními ve spolupráci s Neurologickou klinikou 3. LF a FNKV a Národním ústavem duševního zdraví (NUDZ). Pacienti podepsali informovaný souhlas a studie byly schváleny Etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Soubory pacientů s CIS a RS z Neurologické kliniky 1.LF UK, jsou plánovány pro stanovení anti-NfL protilátek a imunokomplexů. Pacienti podepsali informovaný souhlas a studie byly schváleny Etickou komisí 1. LF UK a VFN. U těchto vzorků byly stanoveny koncentrace NfL v likvoru. Pro biochemickou analýzu byla klinická data oddělena. Část výsledků ze stanovení NfL v likvoru v souboru SET byla publikována a charakteristika souboru tak je uvedena v příslušných publikacích (*Friedova, Motyl et al. 2020, McComb, Krikheli et al. 2020*).

#### **3.7.1. Studie avidity anti-NfH IgG protilátek u pacientů s Alzheimerovou chorobou**

Pro tuto studii byly sestaveny 2 experimentální skupiny starších osob – kontrolní skupina a AD skupina. Diagnóza AD byla stanovena před odběrem biologického materiálu podle platných kritérií (*Dubois, Feldman et al. 2007*), (*McKhann, Knopman et al. 2011*) a (*Bartos and Raisova 2016*). Obě skupiny byly párované dle věku, v kontrolní skupině tak byly starší osoby bez kognitivního deficitu s normálním MMSE skóre (z ang. Mini Mental State Examination). Základní charakteristiky souboru jsou uvedeny v tabulce 3-2.

**Tabulka 3-2:** Základní sociodemografická data souboru.

|                    | kontrolní skupina | AD skupina |
|--------------------|-------------------|------------|
| počet pacientů     | 30                | 30         |
| věk                | 72±5              | 74±8       |
| pohlaví            | 63% ženy          | 77% ženy   |
| MMSE skóre (0-30b) | 29±1              | 19±6       |

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka.

### 3.7.2. Studie anti-NfH IgG protilátek a imunokomplexů s těžkými řetězci neurofilament

Tuto studii lze dále rozdělit na 2 – pilotní stanovení zaměřené na analytické aspekty a vlastní stanovení u pacientů s Alzheimerovou chorobou a mírným kognitivním deficitem.

Pilotní stanovení bylo provedeno celkem u 53 vzorků, do kontrolní skupiny (označované jako symptomatické kontroly – SC dle (*Teunissen, Menge et al. 2013*)) bylo zařazeno 34 osob a do skupiny pacientů s RS 19 osob. Základní charakteristika je shrnuta v tabulce 3-3.

**Tabulka 3-3:** Základní data pilotního souboru

|         | Kontrolní skupina – SC (n = 34) | Skupina RS (n = 19)  |
|---------|---------------------------------|----------------------|
| Věk     | 36,6 (± 9,9)                    | 36,9 (± 8,6)         |
| Pohlaví | 55,9% (Ž), 44,1% (M)            | 73,7% (Ž), 26,3% (M) |

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr a směrodatná odchylka.

Klíčové pro tuto práci bylo stanovení anti-NfH IgG protilátek a imunokomplexů u pacientů s Alzheimerovou chorobou (AD) a mírnou kognitivní poruchou (MCI). Základní charakteristiky tohoto souboru jsou shrnuty v tabulce 3-4.

**Tabulka 3-4:** Základní charakteristika souboru pro stanovení anti-NfH IgG protilátek.

|                                    | <b>Kontroly</b> | <b>MCI</b>   | <b>AD</b>    |
|------------------------------------|-----------------|--------------|--------------|
| počet vzorků                       | 24              | 27           | 20           |
| <b>Věk v době odběru</b>           | 69,2 (±6,6)     | 68,2 (±8,9)  | 74,2 (±7,2)  |
| <b>Pohlaví</b>                     | 41,7 % ženy     | 48,1 % ženy  | 50% ženy     |
| <b>MMSE skóre (0-30)</b>           | 29 (±1,4)       | 26,9 (±2,3)  | 20,5 (±3,6)  |
| <b>ACE skóre (0 - 100)</b>         | 93,4 (±6,2)     | 84,1 (±6,7)  | 60,4 (±12,9) |
| <b>celkový tau protein (pg/ml)</b> | 253,9 (±139)    | 536,5 (±411) | 644,3 (±561) |
| <b>p-tau protein (pg/ml)</b>       | 34,1 (±18,9)    | 55,4 (±35,1) | 56,3 (±33,8) |
| <b>amyloid β42 (pg/ml)</b>         | 861,6 (±356)    | 724,5 (±318) | 650,8 (±362) |

MMSE – z angl. Mini-Mental State Examination; ACE – z angl. Addenbrooke´s Cognitive examination = neuropsychologické testy používané k vyšetření kognitivních funkcí

p – tau – hyperfosforylovaný tau protein; celkový tau protein a amyloid β42 = základní biochemické parametry vyšetřované v likvoru pro diagnostiku Alzheimerovy choroby

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr spolu se směrodatnou odchylkou.

### 3.8. Statistika

Statistické analýzy byly provedeny v programu Statistica v12 (Statsoft, Dell, ČR) a GraphPad Prism v9 (GraphPad, USA). Pro ověření normality byl použit Shapiro-Wilkův test. Pro korelační analýzy by využíván Spearmanův korelační koeficient. Pro analýzu párových měření byl používán Wilcoxonův párový test. Pro srovnání mezi skupinami pacientů byl používán Mann-Whitneyův test a ANOVA. Hladina významnosti byla nastavena na  $p < 0,05$ .

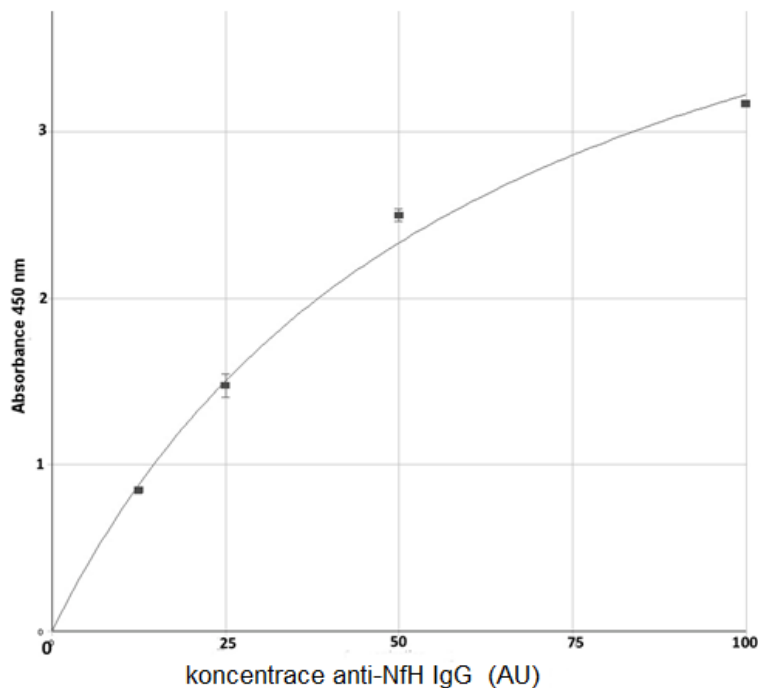
## 4. Výsledky

### 4.1. Stanovení avidity protilátek proti těžkým řetězcům neurofilament

Metoda pro stanovení avidity anti-NfH IgG protilátek byla nejprve optimalizována s několika základními kroky – volba vhodného ředění séra, chaotropního činidla a jeho koncentrace. Tato optimalizace proběhla pouze na 20 vzorcích séra. Po optimalizaci metody následovala studie u pacientů s Alzheimerovou chorobou na souboru uvedeném v kapitole 3.7.1.

#### 4.1.1. Optimalizace stanovení avidity anti-NfH IgG protilátek

Koncentrace anti-NfH IgG protilátek byla vyjádřena v arbitrárních jednotkách koncentrace – AU. Arbitrární jednotky byly odečteny z kalibrační křivky vytvořené v programu Magellan v6, použito bylo nelineární proložení, spolehlivost byla > 95 %. Korelace hladin vyjádřených v AU s vyjádřením pouze hodnoty absorbance byla vysoká – Spearmanův korelační koeficient  $p < 0,0001$ . Stejně tak koreloval aviditní index počítaný z AU a z absorbance  $p < 0,0001$ . Hladiny protilátek je tak možné vyjadřovat v AU. Typická kalibrační křivka je uvedena na obrázku 4-1.

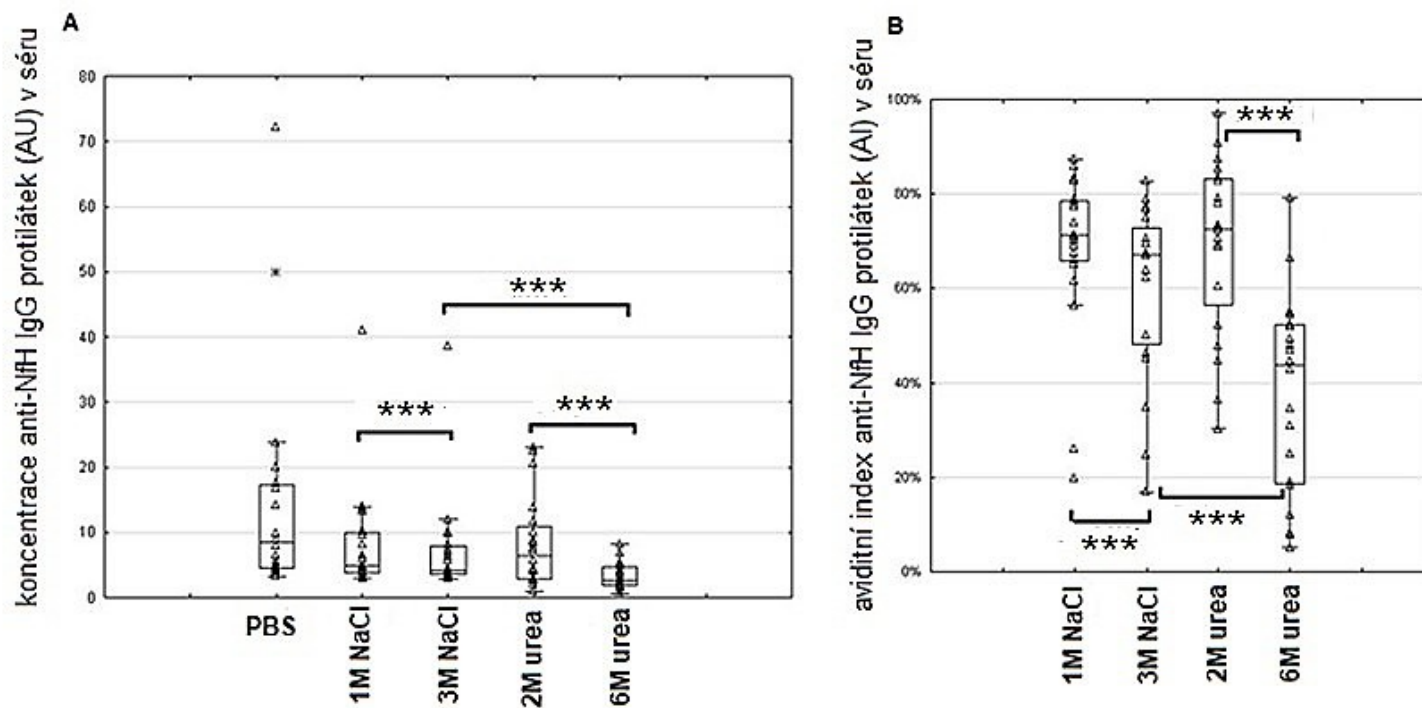


**Obrázek 4-1:** Typická kalibrační křivka s vyjádřením koncentrace anti-NfH IgG protilátek v arbitrárních jednotkách

Optimální ředění séra pro toto stanovení bylo 1:200, kdy hodnoty pro všechna stanovení spadaly do lineární částikalibrační křivky. Pouze v případě výrazně zvýšených hladin protilátek bylo možné použít ředění 1:400.

Pro stanovení avidity a zejména efektivního rozlišení vysoko- a nízkoaviditních protilátek byly porovnány 2 typy chaotropních činidel o různých koncentracích. V případě NaCl se nízké koncentrace 0,25 a 0,5 mol/l ukázaly jako neúčinné v rozrušení vazby antigen-protilátka. Byly proto pro srovnání chaotropních činidel využity pouze vyšší koncentrace 1 mol/l a 3 mol/l. V případě urey byl efekt 2 mol/l roztoku a 4 mol/l podobný a stejně tak 6 mol/l a 8 mol/l. Vzhledem ke zvýšenému riziku denaturace v případě použití nejvyšší koncentrace urey byly pro následující stanovení zvoleny koncentrace 2 mol/l a 6 mol/l.

Při srovnání obou chaotropních činidel bylo prokázáno, že aviditní index příslušných protilátek je podobný při použití 1 mol/l NaCl a 2 mol/l urey, nicméně při použití vyšších koncentrací – 3 mol/l NaCl a 6 mol/l urey již byl pozorován signifikantní rozdíl v aviditním indexu (Wilcoxonův párový test,  $p=0,00016$ ). Spolehlivé stanovení avidity protilátek vyžaduje alespoň 50 % snížení ve vazbě protilátek po působení chaotropního činidla (Pullen, Fitzgerald et al. 1986) a tuto podmínku nejlépe splňuje urea o koncentraci 6 mol/l. Data jsou shrnuta v obrázku 4-2.



**Obrázek 4-2:** Srovnání chaotropních činidel.

**A)** Hladiny sérových anti-NfH IgG protilátek pro různá chaotropní činidla a jejich koncentrace. Pro srovnání je uvedena i hladina bez působení chaotropního činidla (pouze PBS pufr). Signifikantní rozdíl byl nalezen mezi 1 mol/l a 3 mol/l NaCl (Wilcoxon. test,  $p=0,00014$ ) a 2 mol/l a 6 mol/l ureou ( $p<0,0001$ ). Signifikantní rozdíl je i mezi 3 mol/l NaCl a 6 mol/l ureou ( $p=0,000892$ ).

**B)** Srovnání aviditních indexů anti-NfH IgG protilátek pro jednotlivá chaotropní činidla. Signifikantní rozdíl byl nalezen jak při srovnání různých koncentrací činidel mezi sebou, tak i pro 3 mol/l NaCl a 6 mol/l ureu ( $p=0,0002$ )

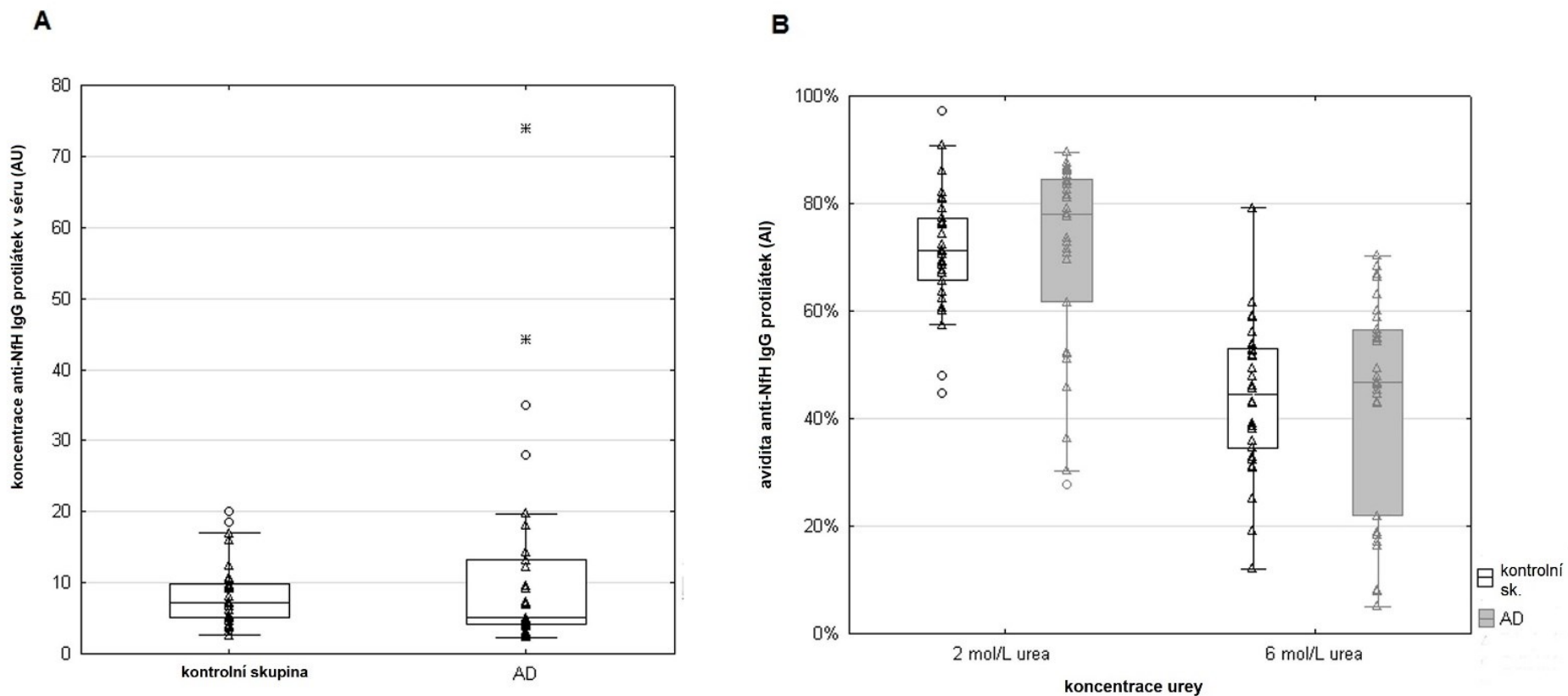
AU – arbitrární jednotky koncentrace; AI – aviditní index v %; NfH – těžký řetězec neurofilament; M – mol/l

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

Krabicový graf zahrnuje medián (horizontální linie) a 25. – 75. percentil hodnot

#### **4.1.2. Hladiny a avidita anti-NfH IgG protilátek v séru u pacientů s Alzheimerovou chorobou**

Po optimalizačních krocích byla avidita anti-NfH IgG protilátek studována u pacientů s Alzheimerovou chorobou ve srovnání s věkově párovaným kontrolním souborem. Nebyl nalezen signifikantní rozdíl v aviditě anti-NfH IgG protilátek mezi kontrolní skupinou a pacienty s AD, stejně tak nebyla nalezena signifikantní korelace mezi hladinou protilátek a jejich aviditou s věkem. Hladiny protilátek vykázaly inverzní korelaci s aviditou. Korelace mezi aviditou a hladinami protilátek byla signifikantní v kontrolní skupině u 2 mol/l urey ( $p = 0,038$ ) i 6 mol/l urey ( $p = 0,00147$ ), naproti tomu v AD skupině byl vztah signifikantní pouze u 6 mol/l urey ( $p = 0,025$ ). Srovnání mezi skupinami je shrnuto v obrázku 4-3, vztah mezi hladinou protilátek a jejich aviditou pak v obrázku 4-4.

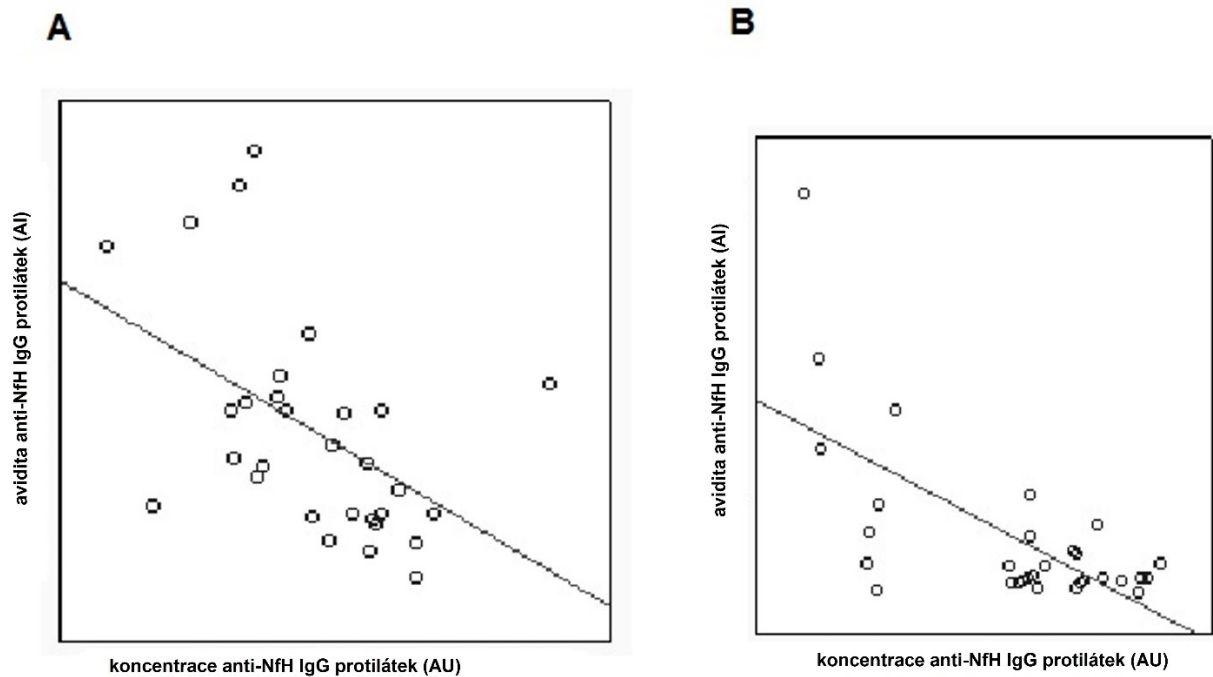


**Obrázek 4-3:** Srovnání hladin a avidity anti-NfH IgG protilátek v séru mezi kontrolní (n=30) a AD skupinou (n=30). **A)** Hladiny protilátek vyjádřené v arbitrárních jednotkách, mezi skupinami nebyl nalezen signifikantní rozdíl. **B)** Avidita protilátek vyjádřená jako aviditní index v procentech. Signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a pacienty s Alzheimerovou chorobou nebyl nalezen.

AU – arbitrární jednotky koncentrace; AI – aviditní index v %; NfH – těžký řetězec neurofilament; M – mol/l

Krabicový graf obsahuje medián (horizontální linie), 25. – 75. percentil hodnot





**Obrázek 4-4:** Vztah mezi hladinou a aviditou anti-NfH IgG protilátek. Avidita byla stanovena za použití urey o koncentraci 6 mol/l jako chaotropního činidla.

**A)** Kontrolní skupina. ( $R = -0,55$ ; \*\*)

**B)** Skupina pacientů s Alzheimerovou chorobou. ( $R = -0,41$ ; \*)

AI – aviditní index v %; AU – arbitrární jednotky koncentrace; NfH – těžký řetězec neurofilament; R – Spearmanův korelační koeficient

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

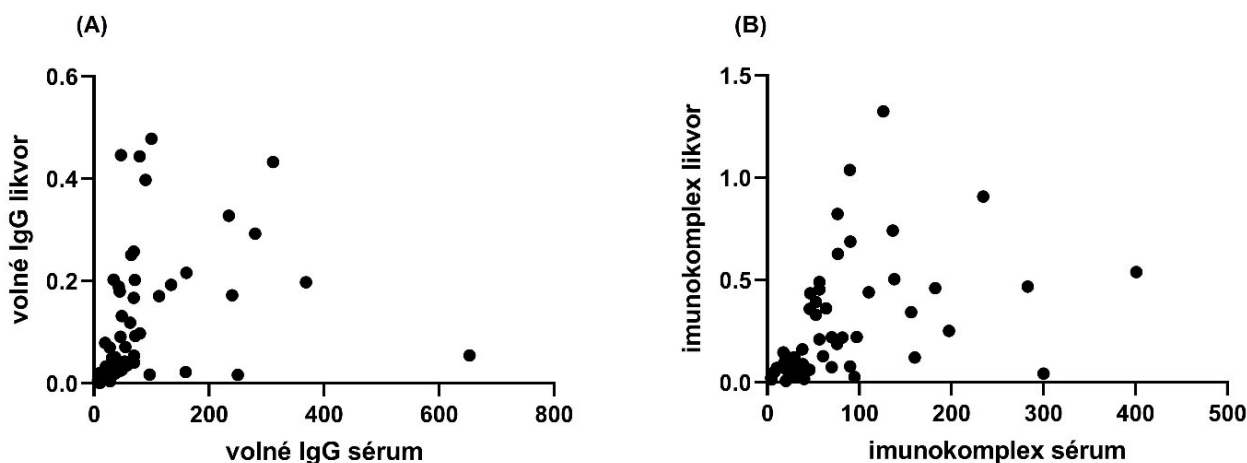
## **4.2. Stanovení volných protilátek proti těžkým řetězcům neurofilament a odpovídajících imunokomplexů s NfH**

Stanovení volných autoprotiátek proti těžkým řetězcům neurofilament proběhlo ve 2 fázích – nejprve na testovacím souboru (viz. kap. 3.7.2), kde nás zajímaly především korelace protilátek v séru a likvoru, případně celkovými IgG. Ve druhé fázi byl potom sestaven soubor kontrolní skupiny, pacientů s mírným kognitivním deficitem a Alzheimerovou chorobou.

### **4.2.1. Optimalizace metody stanovení volných protilátek proti těžkým řetězcům neurofilament a odpovídajících imunokomplexů**

Stanovení bylo co nejvíce unifikováno, aby bylo možné mezi sebou hladiny co nejlépe porovnávat. Proběhlo vždy paralelní stanovení volných protilátek i imunokomplexů v séru a likvoru. Kalibrační systém byl pro stanovení volných protilátek i imunokomplexů totožný. Hladiny v séru byly násobeny příslušným ředěním vzorku, likvor byl nanášen neředěný.

Pro hodnocení byly použity neparametrické statistické testy, protože soubor neodpovídal klasickému Gaussovu rozložení (ověřeno Shapiro-Wilkovým testem). Korelace mezi jednotlivými stanovenými parametry jsou shrnuty v obrázcích 4-5 a 4-6.

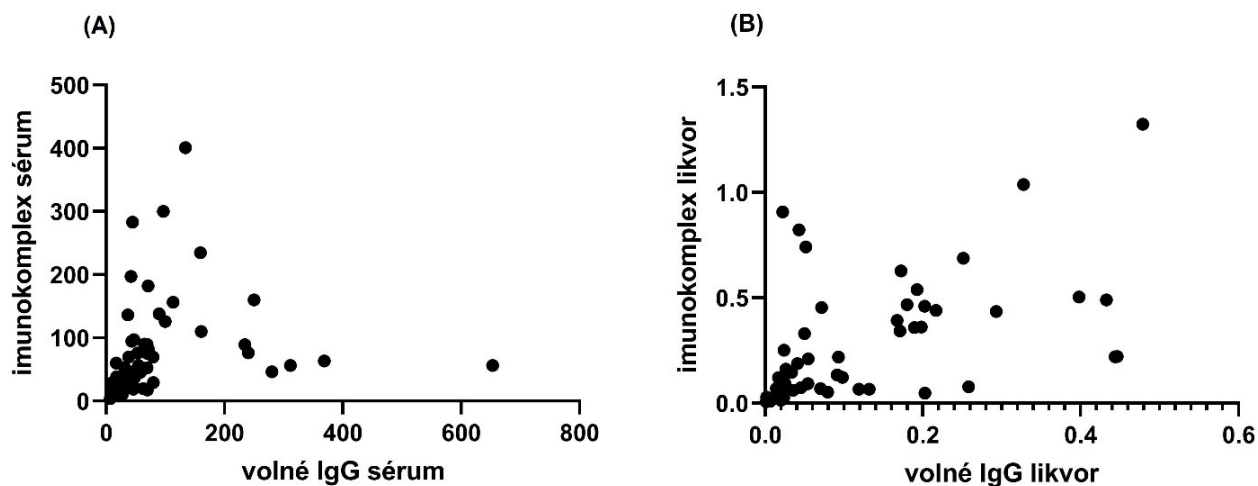


**Obrázek 4-5:** Korelace anti-NfH IgG protilátek a odpovídajících imunokomplexů s NfH. Koncentrace je vyjádřena v arbitrárních jednotkách AU.

(A) Korelace volných anti-NfH IgG protilátek v séru a v likvoru. ( $R = 0,595$  \*\*\*)

(B) Korelace anti-NfH IgG protilátek vázaných v imunokomplexech s NfH v séru a likvoru. ( $R = 0,631$  \*\*\*)

NfH - těžký řetězec neurofilament; R – Spearmannův korelační koeficient; \*\*\*  $p < 0,001$



**Obrázek 4-6:** Korelace anti-NfH IgG protilátek a odpovídajících imunokomplexů s NfH v séru a likvoru. Koncentrace je vyjádřena v arbitrárních jednotkách AU.

(A) Korelace volných protilátek a odpovídajících imunokomplexů v séru. ( $R = 0,589$  \*\*\*)

(B) Korelace volných protilátek a odpovídajících imunokomplexů v likvoru. ( $R = 0,628$  \*\*\*)

NfH - těžký řetězec neurofilament; R – Spearmannův korelační koeficient; \*\*\*  $p < 0,001$

Korelace volných protilátek mezi sérem a likvorem je vysoká, stejně tak korelace protilátek vázaných v imunokomplexech. Vysokou míru korelace vykazují oba

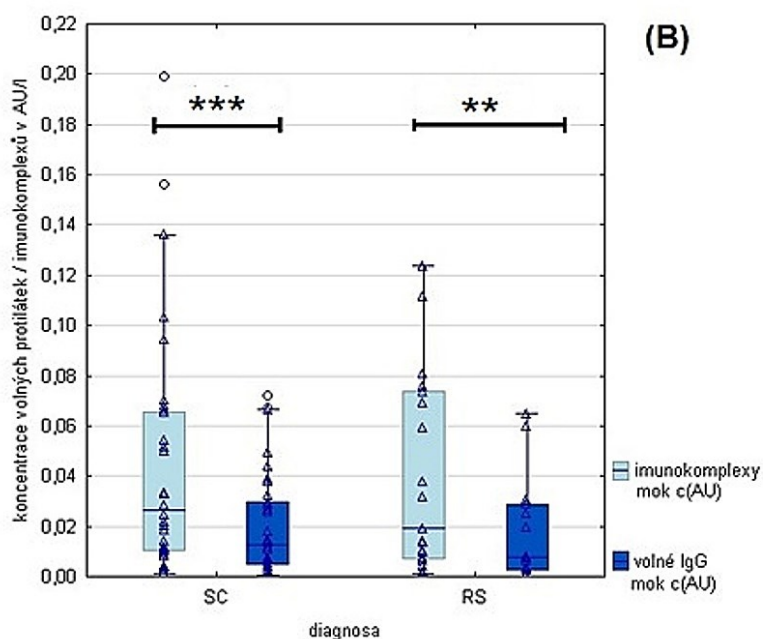
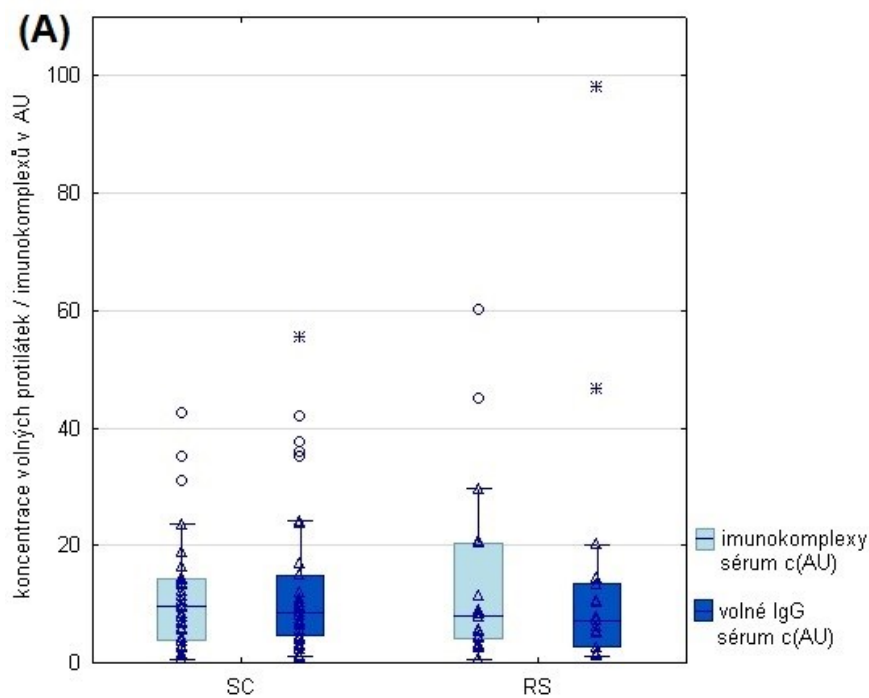
parametry i při srovnání stanovení dle biologického materiálu. V případě rozdělení souboru podle diagnózy jsou korelace stále významné, jak shrnuje tabulka 4-1.

**Tabulka 4-1:** Shrnutí korelací volných a vázaných protilátek po rozdělení na skupiny podle diagnózy.

| <b>Kontrolní skupina (SC)</b>    |             | <b>Spearman R</b> | <b>Pacienti s RS (RS)</b>        |             | <b>Spearman R</b> |
|----------------------------------|-------------|-------------------|----------------------------------|-------------|-------------------|
| volné protilátky                 | sérum x mok | 0,514 **          | volné protilátky                 | sérum x mok | 0,630 **          |
| imunokomplexy                    | sérum x mok | 0,528 **          | imunokomplexy                    | sérum x mok | 0,665 **          |
| volné protilátky x imunokomplexy | sérum       | 0,615 ***         | volné protilátky x imunokomplexy | sérum       | 0,539 *           |
| volné protilátky x imunokomplexy | mok         | 0,630 ***         | volné protilátky x imunokomplexy | mok         | 0,619 **          |

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

Po provedení párového porovnání (Wilcoxonův párový test) obou parametrů v séru a likvoru jsme zjistili signifikantně odlišné hladiny protilátek vázaných v imunokomplexech v likvoru ( $p^{***}$ ) pro celý soubor i pokud bylo rozdělení na kontrolní skupinu (SC) a skupinu pacientů s RS. Výsledky jsou shrnuty v obrázku 4-7.



**Obrázek 4-7:** Párové porovnání volných protilátek a protilátek vázaných v imunokomplexech s NfH v séru a likvoru u kontrolní skupiny a pacientů s RS.

**(A)** Hladiny protilátek a imunokomplexů v séru se neliší.

**(B)** Hladiny protilátek a imunokomplexů s likvoru. Signifikantně vyšší část protilátek je vázána v imunokomplexech. (Wilcoxonův párový test)

AU – arbitrární jednotky koncentrace; SC – kontrolní skupina; RS – skupina pacientů s roztroušenou sklerózou

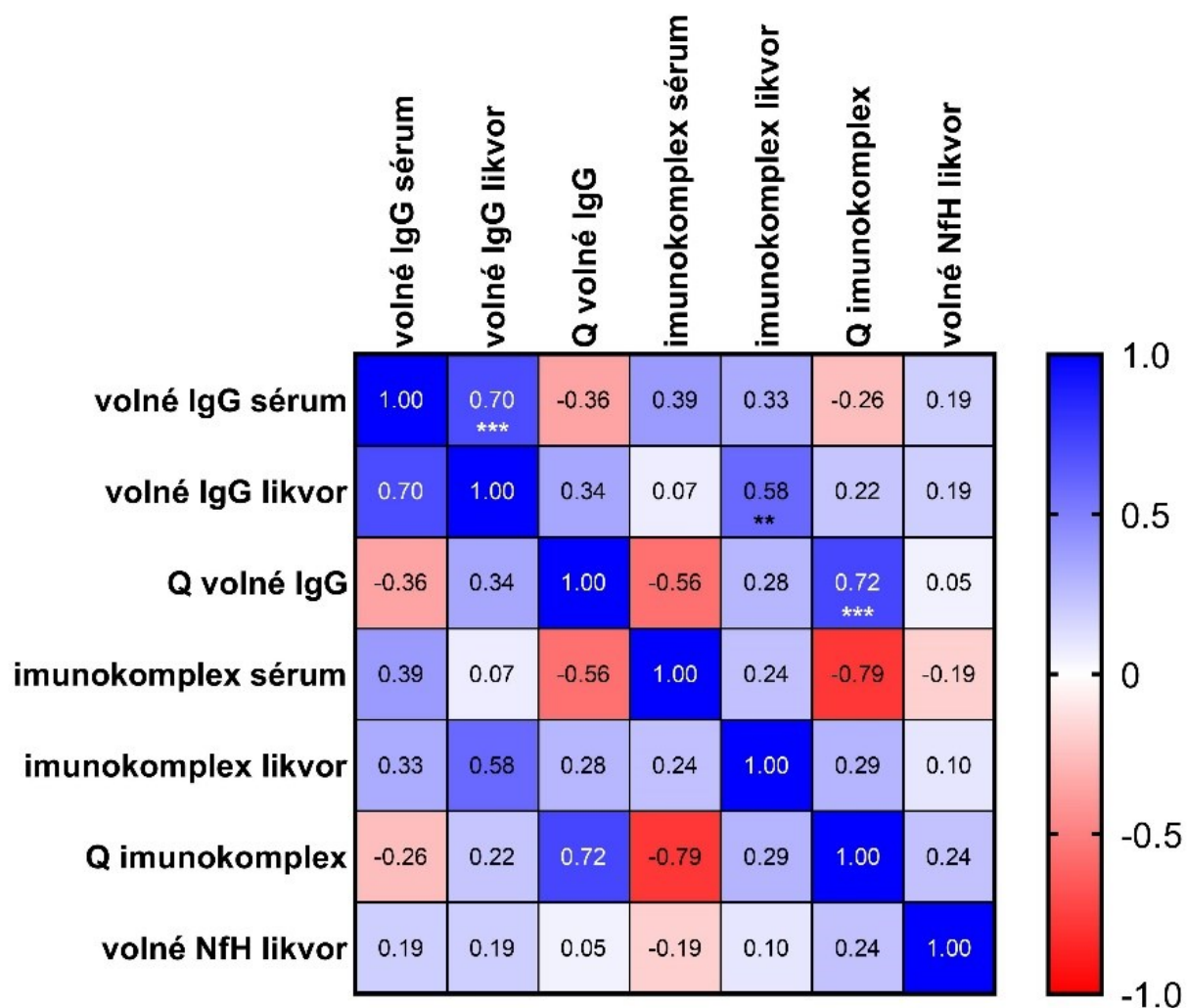
Krabicový graf obsahuje medián (horizontální linie), 25. – 75. percentil hodnot \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

Při porovnání skupin v tomto experimentu nebyl nalezen signifikantní rozdíl v hladinách volných protilátek a protilátek vázaných v imunokomplexech s NfH mezi kontrolní skupinou a skupinou pacientů s RS.

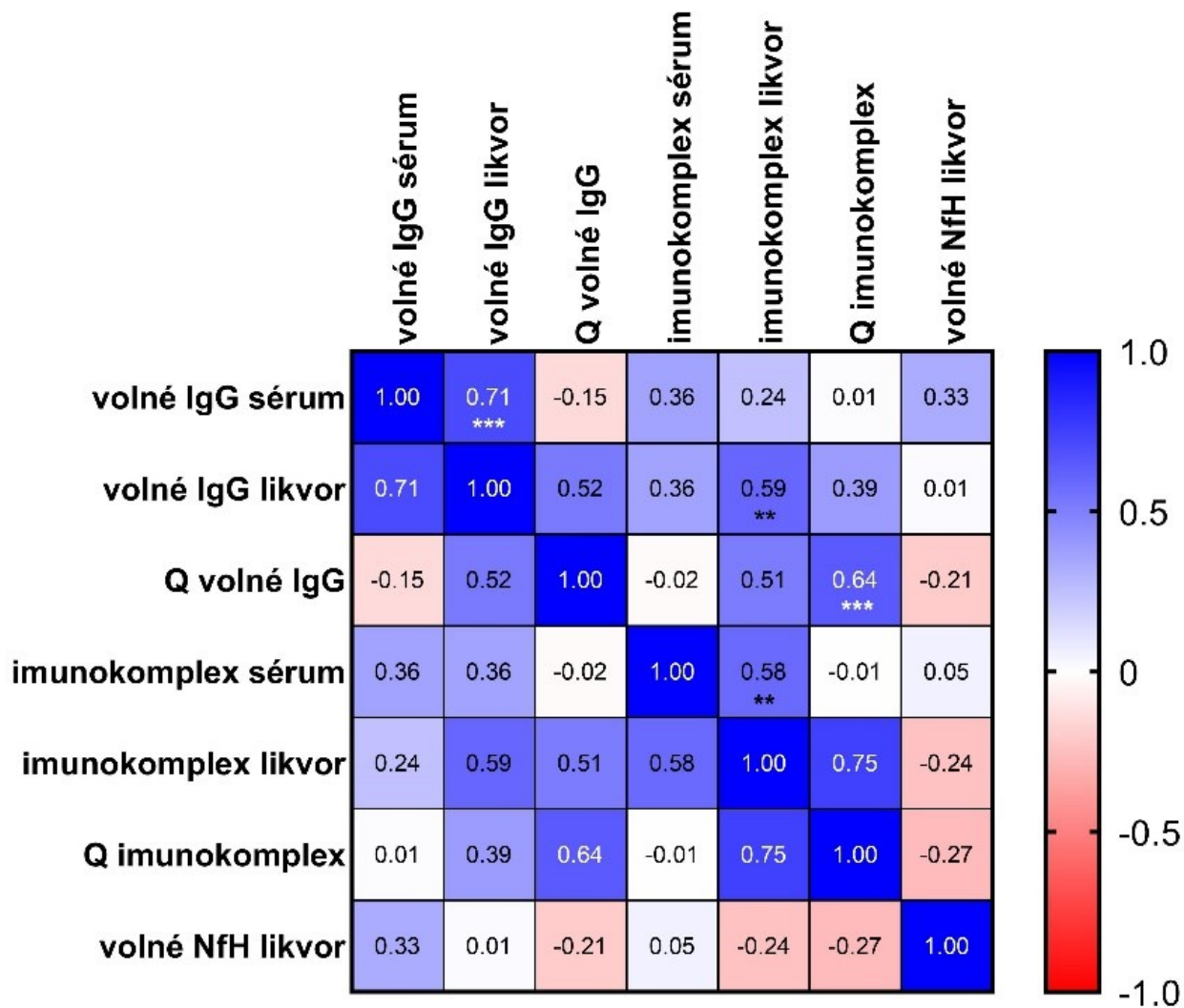
#### **4.2.2. Stanovení volných anti-NfH IgG protilátek a imunokomplexů u pacientů s Alzheimerovou chorobou**

Po stanovení protilátek a příslušných imunokomplexů v pilotním souboru byly tyto parametry stanoveny ve věkově párovaném souboru kontrolních vzorků (kognitivně zdraví pacienti), pacientů s mírnou kognitivní poruchou (MCI) a pacientů s Alzheimerovou chorobou– základní charakteristiky souboru jsou shrnuty v kapitole 3.7.2.

Korelace hladin volných protilátek i imunokomplexů je velmi dobrá při srovnání séra a mozkomíšního moku. Při srovnání hladin imunokomplexů s volnými protilátkami je korelace významná především v likvoru. Při srovnání jednotlivých skupin pacientů jsou největší korelace ve skupině pacientů s Alzheimerovou chorobou. Nižší korelace hladin protilátek a imunokomplexů v kontrolní skupině a skupině MCI může být dána vyšší heterogenitou souboru. Korelační matice pro jednotlivé soubory jsou shrnuty v obrázcích 4-8,9,10.

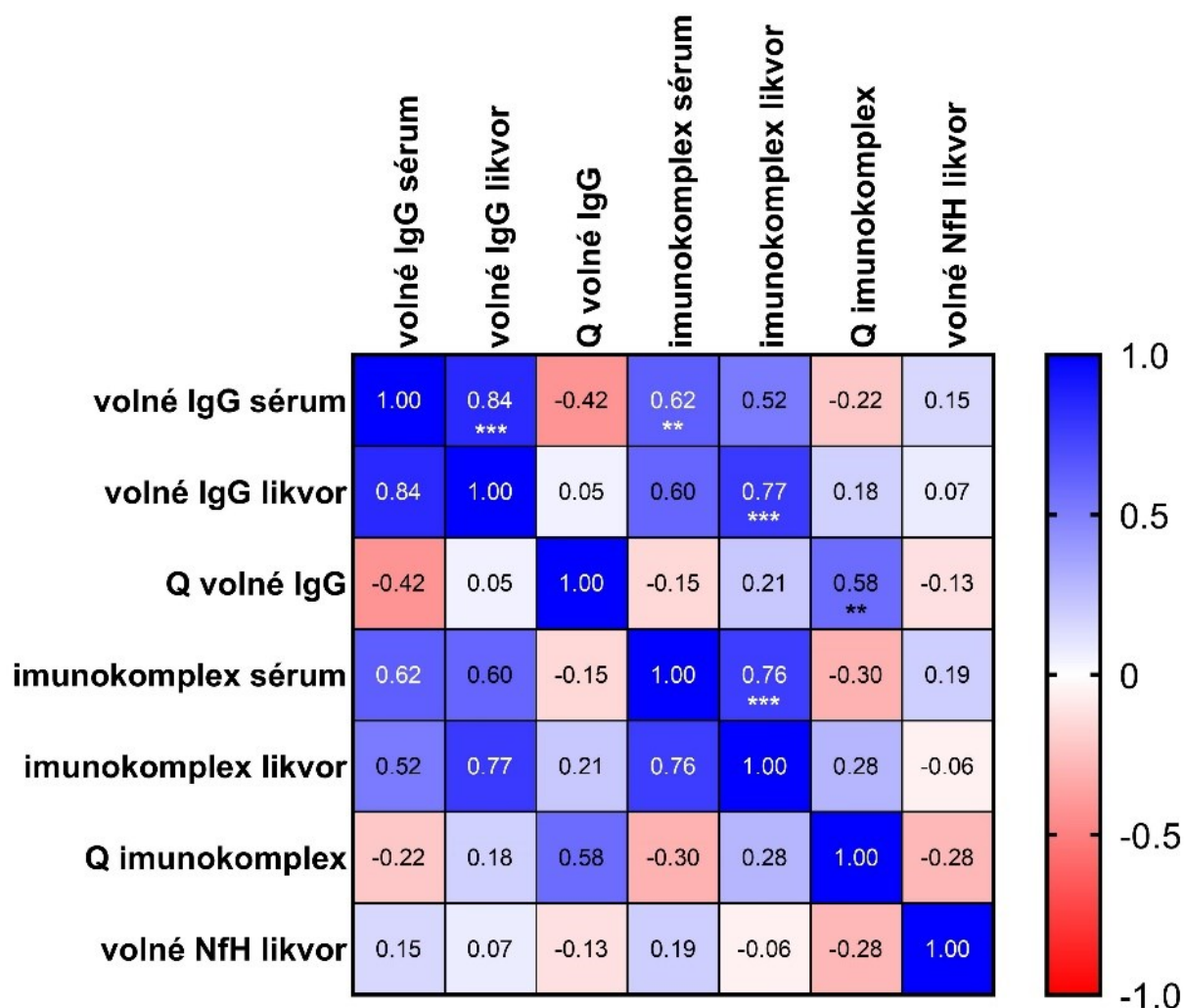


**Obrázek 4-8:** Korelace jednotlivých parametrů v rámci kontrolní skupiny. Významná je korelace volných protilátek mezi sérem a likvorem, protilátek a imunokomplexů v likvoru a také imunoglobulinových indexů Q. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$



**Obrázek 4-9:** Korelace jednotlivých parametrů v rámci skupiny pacientů s mírným kognitivním deficitem. Významná je korelace volných protilátek i imunokomplexů mezi sérem a likvorem, protilátek a imunokomplexů v likvoru a také imunoglobulinových indexů Q. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$





**Obrázek 4-10:** Korelace jednotlivých parametrů v rámci skupiny pacientů s Alzheimerovou chorobou. Významná je korelace volných protilátek i imunokomplexů mezi sérem a likvorem, protilátek a imunokomplexů v likvoru i séru a také imunoglobulinových indexů Q.

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

V případě skupiny pacientů s Alzheimerovou chorobou je mezi volnými protilátkami a protilátkami vázaných v imunokomplexech s NfH úzký vztah. V rámci srovnání všech skupin je vidět, že v likvoru je vztah volných protilátek a imunokomplexů významnější oproti séru.

V případě srovnání hladin jednotlivých parametrů mezi skupinami, je viditelné snížení jak volných protilátek, tak imunokomplexů u skupiny pacientů s mírnou kognitivní poruchou (MCI) zejména oproti kontrolní skupině. Signifikantně se tento rozdíl projevuje zejména u volných anti-NfH IgG protilátek a především v mozkomíšním moku. Při srovnání pacientů s mírnou kognitivní poruchou

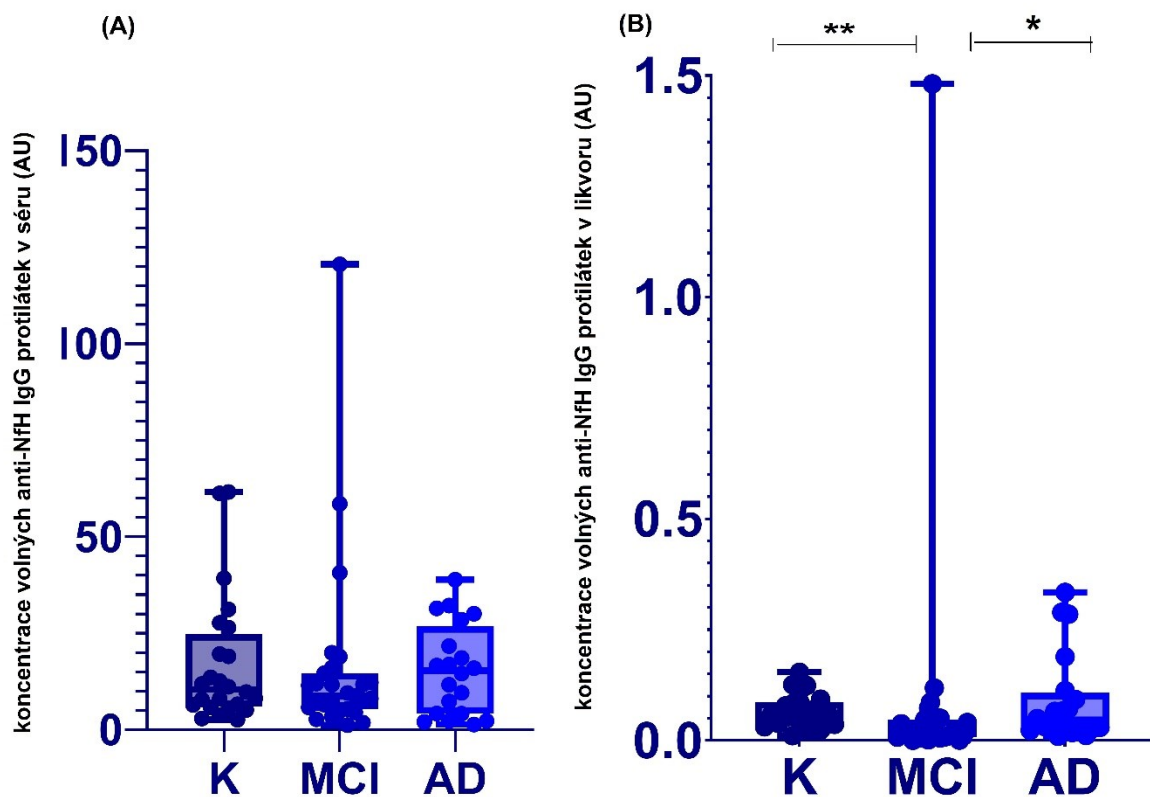
a Alzheimerovou chorobou je rozdíl menší. Hladiny jednotlivých parametrů jsou uvedeny v tabulce 4-2. Získané výsledky shrnuté v obrázku 4-11 a 4-12 naznačují, že anti-NfH IgG protilátky mohou patřit do obou možných kategorií. Protilátky detekované u kontrolní skupiny budou spíše tzv. přirozeně se vyskytující protilátky (NAbs), podílející se na eradikaci hromadících se nebo potenciálně patologických proteinů, spíše než mezi protilátky s patofyziologickým kontextem, které jsou produkovány jako imunitní odpověď. Snížení jasně patrné u pacientů s MCI, tedy počáteční fází onemocnění, oproti kontrolní skupině může značit aktivaci eradikační funkce NAb. V případě pokročilé fáze onemocnění Alzheimerovou chorobou pak už pravděpodobně tyto mechanismy selhávají, dochází ke zvýšení koncentrace antigenu může dojít k tvorbě i druhého typu autoprotilátek – patologických.

**Tabulka 4-2:** Hladiny volných anti-NfH IgG protilátek a protilátek vázaných v imunokomplexech s NfH v rámci jednotlivých skupin pacientů.

|   | <b>Biologický materiál</b> | <b>Kontroly</b>          | <b>MCI</b>                | <b>AD</b>               |
|---|----------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| počet vzorků                            |                            | 24                       | 27                        | 20                      |
| <b>volné anti-NfH IgG protilátky</b>    | sérum (AU)                 | 10.47 (5.97 - 24.78)     | 8.78 (5.45 - 14.66)       | 15.3 (4.2 - 26.82)      |
|   | likvor (AU)                | 0.0567 (0.0363 - 0.0866) | 0.0217 (0.00757 - 0.0469) | 0.0466 (0.0273 - 0.108) |
| <b>anti-NfH IgG - NfH imunokomplexy</b> | sérum (AU)                 | 14.21 (10.4 - 25.04)     | 10.22 (4.12 - 17.46)      | 10.88 (5.29 - 26.32)    |
|   | likvor (AU)                | 0.145 (0.0703 - 0.182)   | 0.0575 (0.0226 - 0.107)   | 0.101 (0.0516 - 0.237)  |

AU – arbitrární jednotky koncentrace; NfH – těžký řetězec neurofilament; MCI – pacienti s mírnou kognitivní poruchou; AD – pacienti s Alzheimerovou chorobou

Hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí.



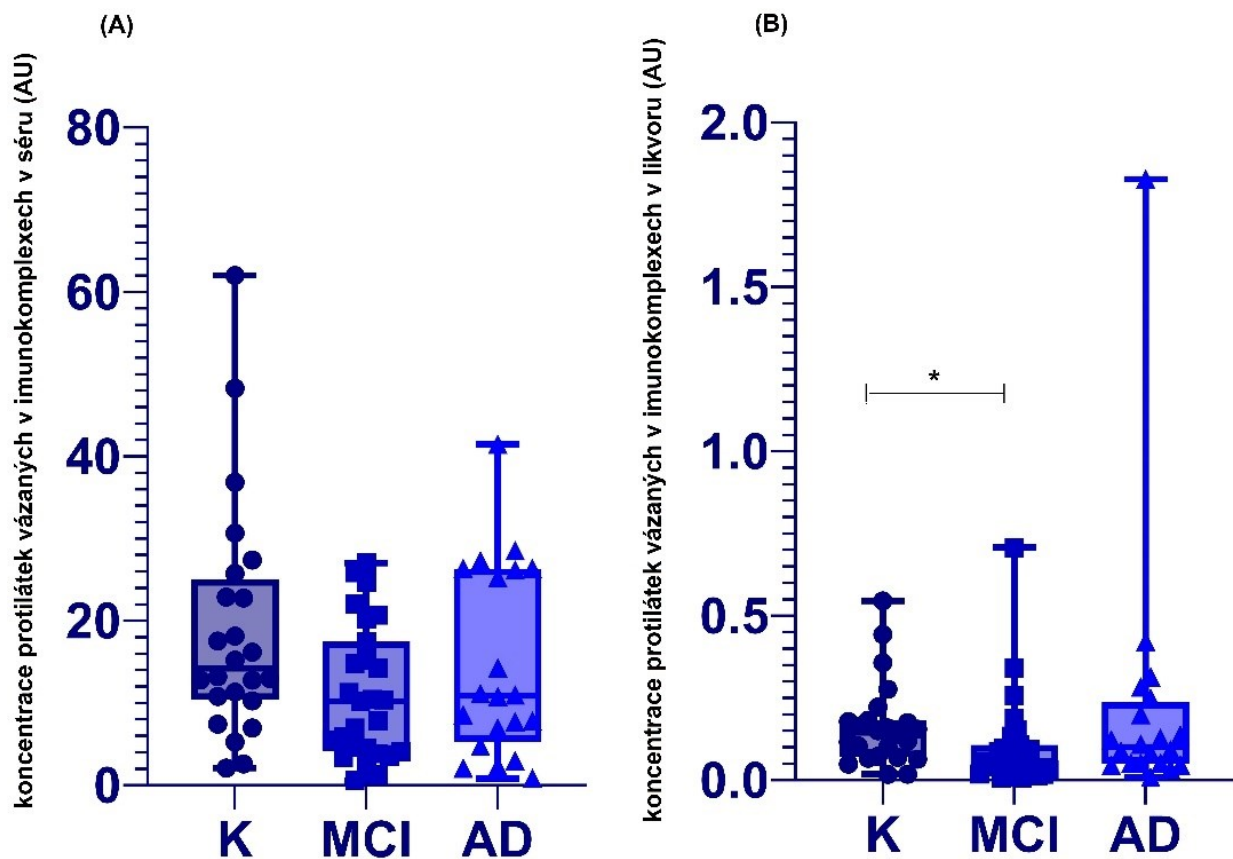
**Obrázek 4-11:** Hladiny volných protilátek u jednotlivých skupin pacientů.

(A) Hladiny protilátek v séru, bez statisticky signifikantního rozdílu.

(B) Hladiny protilátek v mozkomíšním moku, hladiny se významně liší mezi skupinami.

Horizontální linie označuje medián, krabice pak interkvartilové rozpětí.

Kruskal-Wallis ANOVA; \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$



**Obrázek 4-12:** Hladiny protilátek vázaných v imunokomplexech u jednotlivých skupin pacientů.

**(A)** Hladiny imunokomplexů v séru, bez statisticky signifikantního rozdílu.

**(B)** Hladiny imunokomplexů v mozkomíšním moku, hladiny se významně liší mezi pacienty s mírnou kognitivní poruchou a kontrolní skupinou.

Horizontální linie označuje medián, krabice pak interkvartilové rozpětí.

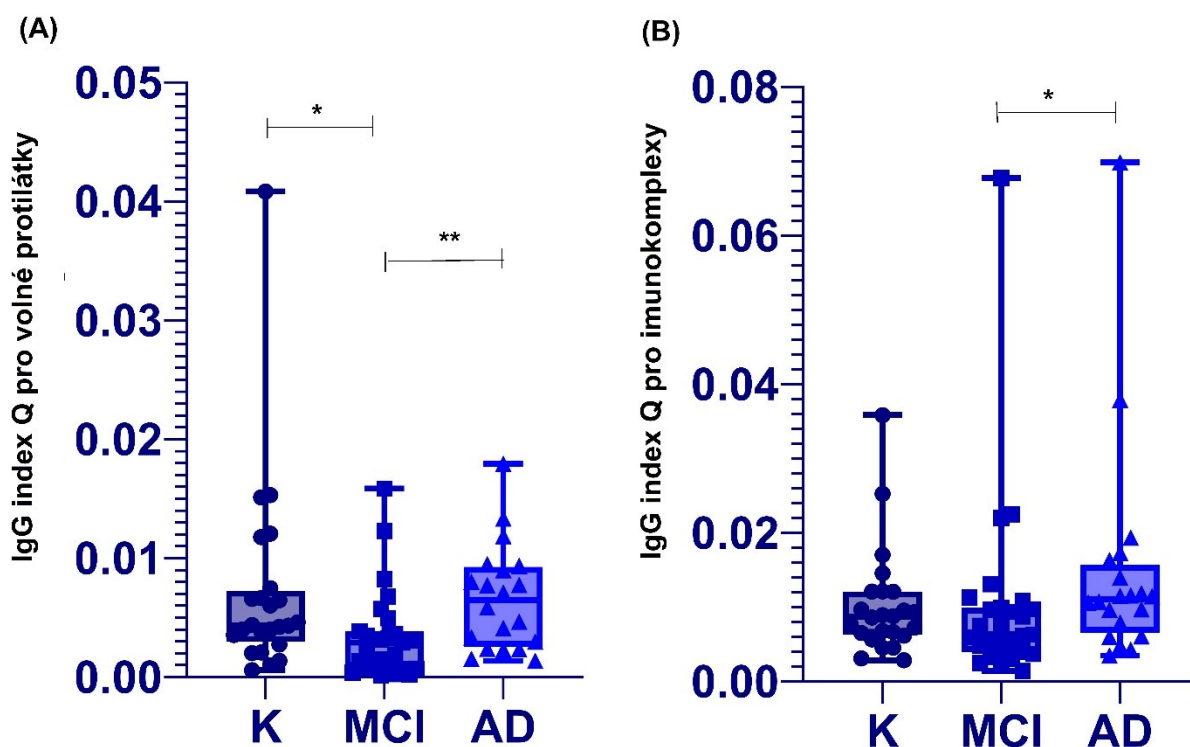
Kruskal-Wallis ANOVA; \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

Při vyjádření protilátek a imunokomplexů jako index Q, vidíme signifikantní rozdíly mezi skupinami v případě volných protilátek. Pokud porovnáme index Q u protilátek vázaných v imunokomplexech, je významný rozdíl pouze mezi pacienty s MCI a AD. Hodnoty indexu Q jsou u pacientů s Alzheimerovou chorobou nejvyšší. Data jsou shrnuta v tabulce 4-3 a obrázku 4-13 na následující straně.

**Tabulka 4-3:** Srovnání hodnot indexů Q mezi jednotlivými skupinami.

|                                 | Kontroly                    | MCI                          | AD                          |
|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| počet vzorků                    | 24                          | 27                           | 20                          |
| IgG index Q<br>volné protilátky | 0,00436 (0,00295 - 0,00728) | 0,00291 (0,000782 - 0,00386) | 0,00648 (0,00253 - 0,00926) |
| IgG index Q<br>imunokomplexy    | 0,00871 (0,00626 - 0,0121)  | 0,00633 (0,00399 - 0,00993)  | 0,0111 (0,00625 - 0,0157)   |

Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián a interkvartilové rozpětí.



**Obrázek 4-13:** Srovnání IgG indexů Q mezi skupinami.

**(A)** Hodnoty Q pro volné protilátky. Signifikantní rozdíly jsou v MCI skupině oproti oběma zbývajícím.

**(B)** Hodnoty Q pro imunokomplexy. Signifikantní rozdíl je mezi pacienty s mírnou kognitivní poruchou a Alzheimerovou chorobou.

Q = hladina v mozkomíšním moku / hladina v séru

Horizontální linie označuje medián, krabice pak interkvartilové rozpětí.

Kruskal-Wallis ANOVA; \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$

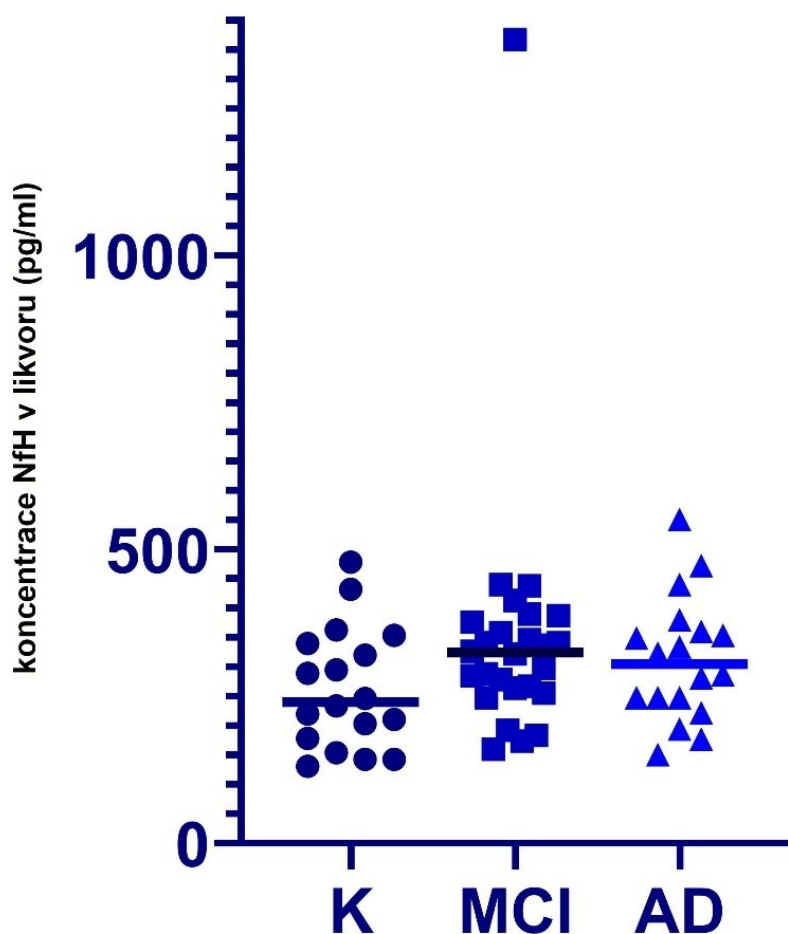
### 4.3. Stanovení volných těžkých řetězců neurofilament

Stanovení volných těžkých řetězců neurofilament v séru a mozkomíšním moku bylo provedeno komerčně dostupným ELISA kitem. Výrobce neuvádí bližší specifikace použitých protilátek, nelze tedy zjistit, do kterého regionu proteinové molekuly NfH se váže. Při použití uvedené soupravy bylo možné hodnotit pouze výsledky analyzované v likvoru. V případě analýzy v séru byla naprostá většina hodnot na spodní hranici detekčního limitu a nelze je tak brát za relevantní. Stanovení v séru by tak vyžadovalo citlivější metodu například s využitím technologie Luminex nebo SIMOA.

Volné NfH v mozkomíšním moku byly analyzovány v souboru pacientů s mírnou kognitivní poruchou, Alzheimerovou chorobou a kontrolní skupiny, u kterých bylo provedeno vyšetření volných anti-NfH IgG protilátek a imunokomplexů, vzhledem k nedostatku mozkomíšního moku ne u všech vzorků. Výsledky získané z mozkomíšního moku jsou uvedeny v tabulce 4-4 a obrázku 4-14. Mezi skupinami není zásadní rozdíl v hladině volných NfH, i když v případě skupiny pacientů s mírnou kognitivní poruchou je hladina mírně vyšší oproti kontrolní skupině. Nebyla nalezena ani významná korelace s imunokomplexy nebo volnými protilátkami viz. obrázek 4-8,9,10 v kapitole 4.2.2, hodnoty jsou součástí korelačních matic.

**Tabulka 4-4:** Hladiny volných NfH u jednotlivých skupin.

|              | <b>Kontroly</b>   | <b>MCI</b>         | <b>AD</b>         |
|--------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| počet vzorků | 18                | 26                 | 18                |
| NfH (pg/ml)  | 239.9 (172 - 478) | 324.3 (262 - 1368) | 305.1 (241 - 551) |

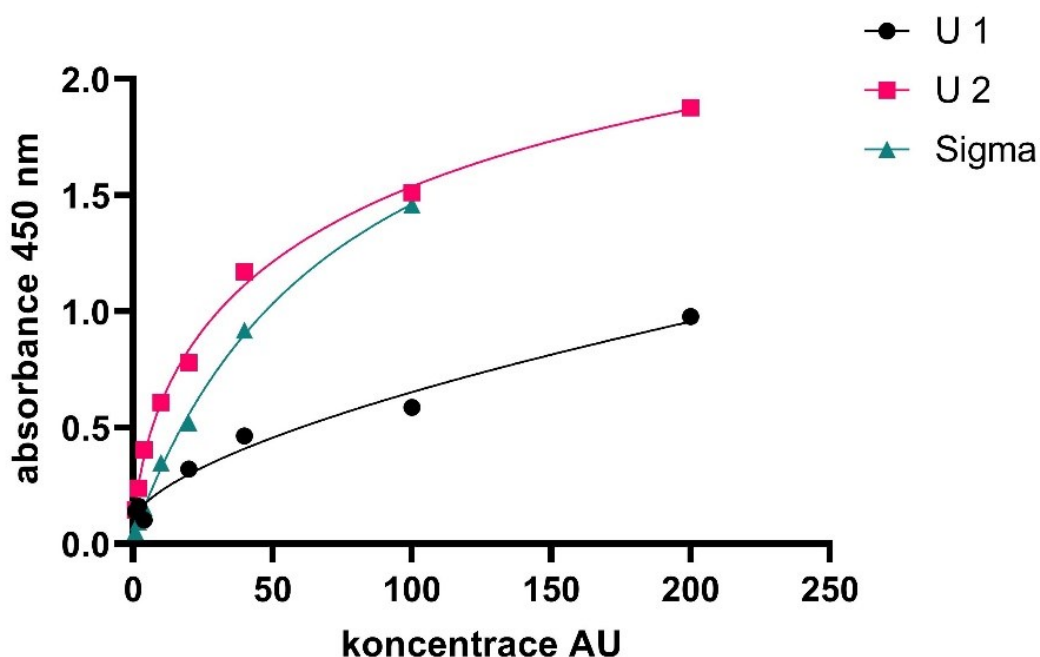


**Obrázek 4-14:** Hladiny těžkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku, bez signifikantního rozdílu mezi skupinami. Horizontální linie značí medián.

#### 4.4. Optimalizace metody pro stanovení imunokomplexů pro lehké řetězce neurofilament

V průběhu optimalizace metody pro stanovení imunokomplexů anti-NfL IgG protilátek byly testovány 2 různé protilátky – anti-NEFL od Sigma Aldrich a UD 1 od Uman Diagnostics. Obě protilátky rozpoznávají sekvenci v centrální (Rod) doméně proteinu s minimálním rozdílem v úseku aminokyselin. V rámci srovnání nebyly mezi protilátkami velké rozdíly. Ale vzhledem k faktu, že UD 1 je využívána i v ELISA kitu pro stanovení NfL, optimalizace se zaměřila na tuto protilátku. Srovnání obou protilátek je na obrázku 4-15.



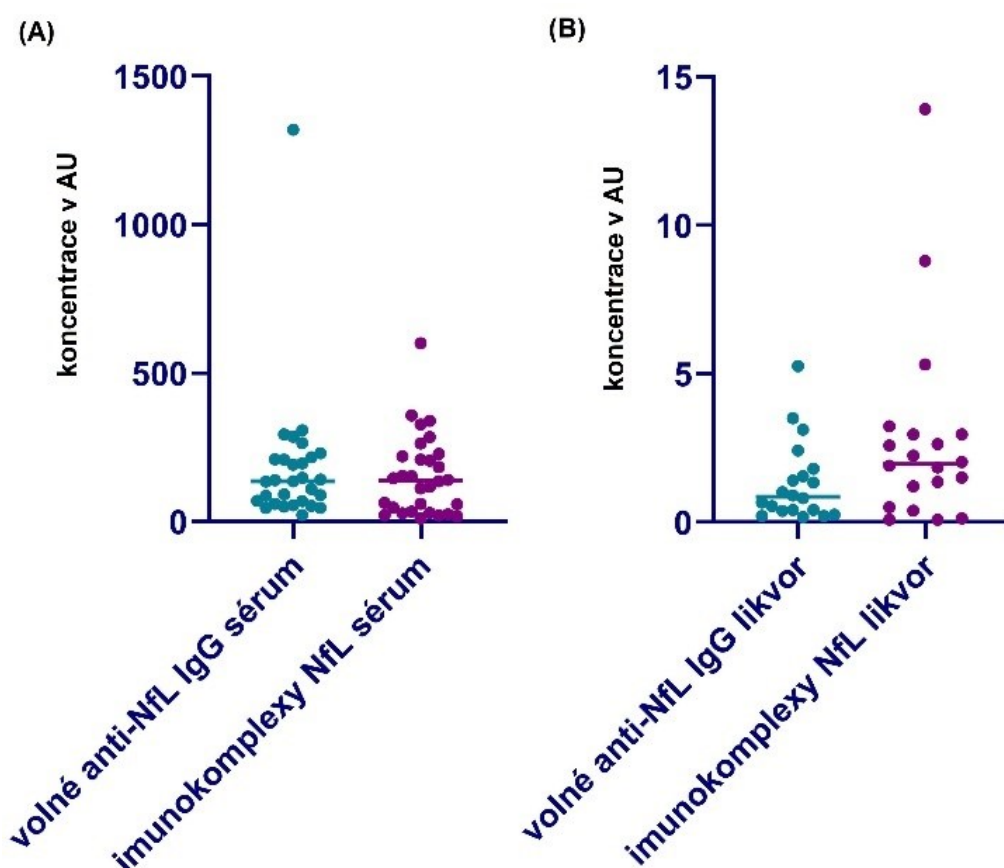


**Obrázek 4-15:** Srovnání protilátek UD 1 a Sigma pro stanovení NfL.

AU – arbitrární jednotky koncentrace; U1 – protilátka UD 1 o koncentraci 1 µg/ml; U2 – protilátka UD 1 o koncentraci 2 µg/ml; Sigma – anti-NEFL protilátka o koncentraci 2 µg/ml; 4-parametrové proložení křivek

Jako optimální protilátka pro stanovení imunokomplexů NfL se ukázala protilátka UD1 od Uman Diagnostics nanášená v koncentraci 1,5 µg/ml. Vzhledem k vyššímu pozadí (absorbance slepého vzorku) bylo třeba dále upravit složení ředícího roztoku pro vzorky a sekundární protilátku-konjugát. Do ředícího roztoku tak byl oproti stanovení NfH přidán ještě TruBlock 3™ v koncentraci 10 µg/ml, což je specifický blokátor heterofilních interferencí v imunoanalytických metodách a byl použit i během prvních optimalizací metody SIMOA (*Kuhle, Barro et al. 2016*).

Základní stanovení bylo provedeno na testovacím souboru pacientů s různou diagnózou (RS, CIS, AD, FTD, ...) celkem na 20 likvorech a 30 sérech, z toho 20 sér bylo párových s příslušným likvorem. Ze získaných dat z testovacího souboru jsme zjistili, že hladiny volných protilátek i imunokomplexů jsou dobře měřitelné s výjimkou některých likvorů a hodnoty spadají do lineární části kalibrační křivky, kde je vysoká přesnost odečtu. Významné korelace byly nalezeny v hladinách imunokomplexů mezi sérem a likvorem (Spearmanův koeficient  $R = 0,839$ ;  $p < 0,0001$ ) a také v séru korelují hladiny volných protilátek a imunokomplexů ( $R = 0,464$ ;  $p = 0,0112$ ). Výsledky jsou shrnuty v obrázku 4-16.

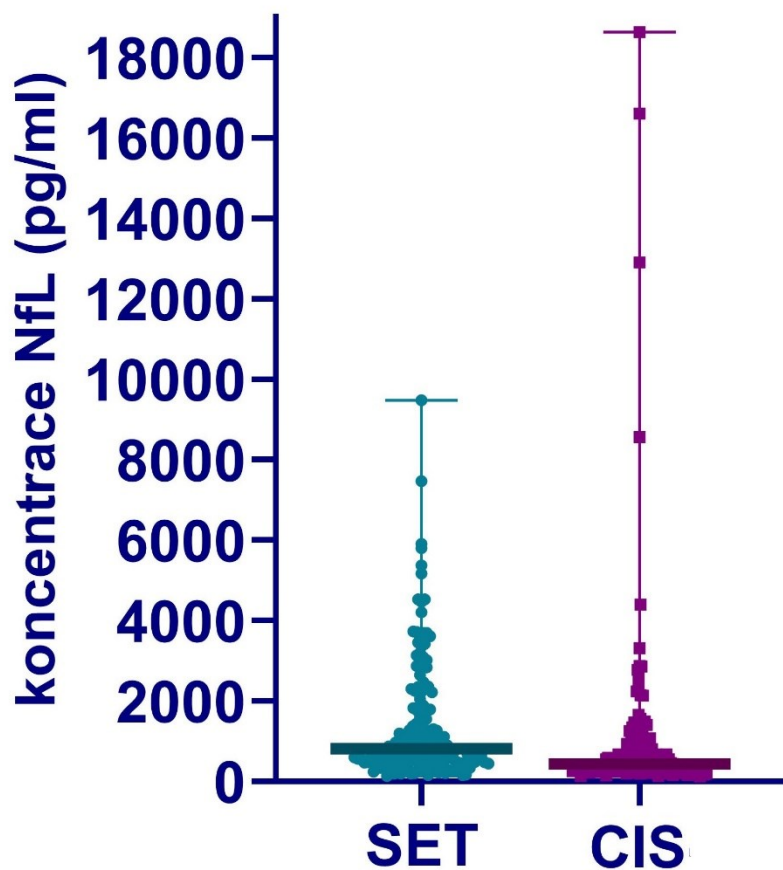


**Obrázek 4-16:** Hladiny protilátek proti lehkému řetězci neurofilament v séru a likvoru.

Vzhledem k tomu, že metoda je optimalizována ke stanovení spolu s volnými NfL díky použití stejné protilátky pro zachycení neurofilament, stanovení anti-NfL IgG protilátek a imunokomplexů rozšíří informace u pacientů s RS / CIS, kteří již mají stanoveny volné NfL v likvoru pomocí CE-IVD ELISA metody UmanDiagnostics.

#### **4.5. Stanovení volných lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku**

Volné lehké řetězce neurofilament byly stanoveny soupravou firmy UmanDiagnostics, která je určena pro stanovení NfL v mozkomíšním moku. Toto stanovení bylo zaměřeno na pacienty s roztroušenou sklerózou a zejména s klinicky izolovaným syndromem ve 2 různých souborech označených jako SET a CIS. Celkem byla v rámci souboru SET provedena analýza 148 likvorů a v rámci souboru CIS 155 likvorů. Hladiny NfL v likvoru pro oba soubory jsou uvedeny v obrázku 4-17.



**Obrázek 4-17:** Hladina volných lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku a pacientů s klinicky izolovaným syndromem. Horizontální linie označuje medián.

Z obrázku 4-17 je jasně patrné, že se mezi soubory hladiny liší. SET je zaměřena na pacienty s RRMS, zatímco CIS na pacienty s klinicky izolovaným syndromem. Oba soubory jsou však založeny na longitudinální analýze souboru a korelaci s dalšími možnými diagnostickými kritérii. Část výsledků ze souboru SET byla již publikována (*Friedova, Motyl et al. 2020, McComb, Krikheli et al. 2020*). Data ze souboru CIS jsou podkladem pro další práce ve spolupráci s Neurologickou klinikou 1.LF UK a VFN.

## 5. Diskuse

Tato práce je zaměřena především na stanovení protilátek proti neurofilamentům a příslušných imunokomplexů. Největší část tvoří studium anti-NfH IgG protilátek u pacientů s Alzheimerovou chorobou.

Optimalizace metod pro stanovení volných protilátek proti neurofilamentům a jejich imunokomplexů s odpovídajícím antigenem umožnila díky maximální unifikaci postupu a shodnému kalibračnímu systému hladiny jednotlivých parametrů srovnávat a hladiny byly měřitelné v séru i mozkomíšním moku.

Prvním krokem bylo stanovení avidity protilátek třídy IgG proti NfH, které jsou součástí cytoskeletu neuronů. Nejprve byla provedena optimalizace metody ELISA a výběr vhodného chaotropního činidla. Poté byla analyzována avidita protilátek u pacientů s Alzheimerovou chorobou.

Avidita je jednou ze základních charakteristik protilátek, která ovlivňuje tvorbu imunokomplexů a efektivitu protilátek. Závisí na afinitě mezi vazebným místem pro antigen na protilátce a epitopy na antigenu a také na jejich valenci (*Gharavi 1996*). Vazba mezi protilátkou a příslušným antigenem je nekovalentní a interakce v takto vytvořeném imunokomplexu jsou pro něj charakteristické a je tak nutné upravit podmínky ELISA metody pro konkrétní protilátky a zvolit vhodné chaotropní činidlo. Mezi využívaná chaotropní činidla patří urea, thiokyanát amonný, guanidin hydrochlorid, diethyl amin nebo chlorid sodný (*Cucnik, Kveder et al. 2004, Woznicova 2004, Cucnik, Kveder et al. 2011, Dimitrov, Lacroix-Desmazes et al. 2011, Cucnik, Kveder et al. 2012, Dauner, Pan et al. 2012*). V této práci byla testována 2 chaotropní činidla odlišná svým chemickým charakterem – NaCl jako silný elektrolyt s iontovým charakterem a urea, naopak bez iontového charakteru, funguje jako mírné denaturační činidlo. Požadavek pro efektivní hodnocení avidity je, aby chaotropní činidlo rozrušilo přibližně 50 % vazeb protilátky a antigenu a toto kritérium splnila urea o koncentraci 6 mol/l, kdy disociovalo zhruba 45 % imunokomplexů.

Z hlediska hodnocení avidity se jako patogenní autoprottilátky označují ty s vyšší aviditou vůči autoantigenům (*Woznicova 2004, Bozic, Cucnik et al. 2005, Schlosser, Koczwara et al. 2005*). Jianping a Cao popsali aviditu protilátek proti  $\beta$ -amyloidu u pacientů s AD, hladina protilátek i avidita byla nižší právě u pacientů s AD oproti věkově párované kontrolní skupině (*Jianping, Zhibing et al. 2006, Cao, Lv et al. 2010*). Předpokládali, že vliv maturace a tolerance B lymfocytů a s tím související produkce

protilátek s různou afinitou a aviditou bude mít vliv na clearance  $\beta$ -amyloidu. Vzhledem k tomu, že další studie prokázaly hladiny protilátek proti  $\beta$ -amyloidu v IVIG přípravcích (Dodel, Du et al. 2004, Kile, Au et al. 2017), nemusí imunitní systém tyto hladiny ovlivňovat, ale na procesu se budou podílet právě NAbs. V našem případě byla nalezena opačná korelace mezi hladinou a aviditou anti-NfH IgG protilátek a avidita spadala převážně do „šedé zóny“, kdy o protilátkách nelze jednoznačně mluvit jako o vysoko – nebo nízkoaviditních. Vysvětlením může být, že vysokoaviditní protilátky jsou vázány ve stabilních imunokomplexech, které se nepovedlo rozrušit chaotropním činidlem. Vyšší hladiny protilátek proti amyloidu vázaných v imunokomplexech popsali Maftai a kol (Maftai, Thurm et al. 2012, Maftai, Thurm et al. 2013). Naproti tomu nízkoaviditní protilátky tvoří méně stabilní imunokomplexy a vyšší hladiny lze očekávat ve formě volných anti-NfH IgG protilátek.

Protilátky jsou obecně u Alzheimerovy choroby poměrně hodně studované (Colasanti, Barbatì et al. 2010, Bartos, Fialova et al. 2012, Beasley and Greer 2015), nicméně závěry ze studií nejsou zcela jednoznačné. Na jedné straně je řada studií, kde je popsán pozitivní efekt podávání IVIG, obsahující zejména NAbs, které mají především fyziologické funkce – v tomto případě hlavně eradikaci uvolněných intracelulárních proteinů a proteinových agregátů (Neff, Wei et al. 2008, Hromadkova, Kolarova et al. 2015, Kile, Au et al. 2017, van Ameijde, Crespo et al. 2018). Na druhé straně však existuje i dostatek studií prokazující zvýšené hladiny protilátek u pacientů s AD (Bartos, Fialova et al. 2012, Maftai, Thurm et al. 2012, Maftai, Thurm et al. 2013).

Naše studie anti-NfH IgG protilátek a imunokomplexů ukázala snížené hladiny jak protilátek, tak imunokomplexů u pacientů s mírnou kognitivní poruchou, zejména oproti kontrolní skupině. V případě kontrolní skupiny jsou také protilátky ve větší míře vázány v imunokomplexech. To by mohlo naznačovat, že se jedná o NAbs, které se starají o eradikaci uvolněných NfH i vzhledem k vyšší míře uvolňování s věkem. V případě začátku onemocnění se tato funkce projeví naplno a celé imunokomplexy jsou tak vylučovány z oběhu. Později s progresí onemocnění může docházet k tvorbě patologických autoprottilátek jako odpověď na některý podnět a hladiny jako takové se opět zvýší. U pacientů s AD jsme zjistili vyšší hladiny volných protilátek oproti imunokomplexům. To by bylo například v souladu se zjištěním (Kile, Au et al. 2017), že podávání IVIGu pacientům s MCI vedlo k větší stabilitě kognitivních funkcí pacientů během prvního roku podávání, zatímco po 2 letech už nebyl prokázán signifikantní efekt. Zvýšení hladiny protilátek i imunokomplexů v mozkomíšním moku u pacientů

s AD oproti pacientům s MCI je i v souladu s dříve prokázanou zvýšenou intratekální syntézou protilátek proti NfH (*Bartos, Fialova et al. 2012*).

Pokud se zaměříme na hladiny protilátek proti neurofilamentům obecně, pak například pro anti-NfL protilátky byla prokázána vyšší intratekální syntéza a hladiny protilátek u pacientů, kteří konvertovali z klinicky izolovaného syndromu (CIS) do roztroušené sklerózy (*Fialova, Bartos et al. 2013*). Tedy největší změna byla zaznamenána při progresi onemocnění, kdy se mohou uplatnit další podněty, například v případě ataky RS může dojít k uvolnění většího množství neurofilament z neuronů a to může být podnětem pro imunitní systém, kdy byla nalezena zvýšená množství protilátek v MS lézích (*Sadaba, Tzartos et al. 2012*).

Pokud tedy shrneme poznatky o autoprotiilátkách s patofyziologickým podtextem a protektivních NAb, je jisté, že pro detailní pochopení funkce protilátek proti neurofilamentům je potřeba dalších, zejména longitudinálních studií se sledováním postupné progresse onemocnění a hladin protilátek a imunokomplexů pro rozšíření a upřesnění poznatků o autoprotiilátkách u neurodegenerativních onemocnění.

## 6. Shrnutí

Prvním cílem této práce byla optimalizace ELISA metod pro stanovení volných protilátek proti lehkému a těžkému řetězci neurofilament a jejich imunokomplexů s odpovídajícím antigenem. Zavedení metodiky na stanovení protilátek proti lehkému a těžkému řetězci neurofilament a odpovídajících imunokomplexů je předpokladem pro analýzu uvedených parametrů v séru a mozkomíšním moku. Tento cíl byl splněn, oba parametry jsme schopni detekovat v séru i mozkomíšním moku a hodnoty pro konkrétní řetězec neurofilament mezi sebou porovnávat.

Druhý cíl této práce byl stanovit hladiny protilátek proti těžkému řetězci neurofilament, jejich imunokomplexů a avidity zejména u pacientů s Alzheimerovou chorobou a zjistit jejich vzájemný vztah. U pacientů s Alzheimerovou chorobou nebyl nalezen signifikantní rozdíl v aviditě oproti věkově párované kontrolní skupině. Při analýze volných protilátek anti-NfH IgG a jejich imunokomplexů nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v hladinách mezi věkově párovanou kontrolní skupinou a pacienty s Alzheimerovou chorobou, což je v souladu s výsledky ze stanovení avidity. Signifikantní rozdíl v hladině volných protilátek i imunokomplexů byl však nalezen při srovnání pacientů s mírnou kognitivní poruchou a to zejména oproti kontrolní skupině, ale i oproti pacientům s AD. Zjistili jsme také, že většina změn v hladinách protilátek a imunokomplexů je lépe pozorovatelná v mozkomíšním moku oproti séru.

Díky zavedeným metodám mohou výsledky získané u větších souborů pacientů s neurodegenerativními onemocněními poskytnout informace, které doplní naše znalosti o uvolňování neurofilament i o protilátkové odpovědi proti nim. Tyto poznatky mohou být využitelné jak z klinického, tak analytického hlediska.

## 7. Seznam použité literatury

Abbas, A. K., A. H. Lichtman and S. Pillai (2015). Cellular and molecular immunology. Philadelphia, PA, Elsevier/Saunders.

Akhtar, R. S., J. P. Licata, K. C. Luk, L. M. Shaw, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2018). "Measurements of auto-antibodies to alpha-synuclein in the serum and cerebral spinal fluids of patients with Parkinson's disease." J Neurochem **145**(6): 489-503.

Albus, A., M. Gold, J. P. Bach, M. Burg-Roderfeld, M. Jordens, Y. Kirchhein, Y. Kronimus, D. Mengel, I. Zerr and R. Dodel (2018). "Extending the functional characteristics of naturally occurring autoantibodies against beta-Amyloid, Prion Protein and alpha-Synuclein." PLoS One **13**(8): e0202954.

Almanzar, G., B. Ottensmeier, J. Liese and M. Prelog (2013). "Assessment of IgG avidity against pertussis toxin and filamentous hemagglutinin via an adapted enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using ammonium thiocyanate." J Immunol Methods **387**(1-2): 36-42.

Baiardi, S., C. Quadalti, A. Mammana, S. Dellavalle, C. Zenesini, L. Sambati, R. Pantieri, B. Polischi, L. Romano, M. Suffritti, G. M. Bentivenga, V. Randi, M. Stanzani-Maserati, S. Capellari and P. Parchi (2022). "Diagnostic value of plasma p-tau181, NfL, and GFAP in a clinical setting cohort of prevalent neurodegenerative dementias." Alzheimers Res Ther **14**(1): 153.

Banzato, A., R. Frasson, L. Acquasaliente, E. Bison, A. Bracco, G. Denas, S. Cuffaro, A. Hoxha, A. Ruffatti, S. Iliceto, V. De Filippis and V. Pengo (2012). "Circulating beta2 glycoprotein I-IgG anti-beta2 glycoprotein I immunocomplexes in patients with definite antiphospholipid syndrome." Lupus **21**(7): 784-786.

Bartos, A., L. Fialova, J. Soukupova, J. Kukal, I. Malbohan and J. Pit'ha (2007). "Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis." J Neurol **254**(1): 20-25.

Bartos, A., L. Fialova, J. Svarcova and D. Ripova (2012). "Patients with Alzheimer disease have elevated intrathecal synthesis of antibodies against tau protein and heavy neurofilament." J Neuroimmunol **252**(1-2): 100-105.

Bartos, A. and M. Raisova (2016). "The Mini-Mental State Examination: Czech Norms and Cutoffs for Mild Dementia and Mild Cognitive Impairment due to Alzheimer's Disease." Dement Geriatr Cogn Disord **42**(1-2): 50-57.



- Bateman, R. J., P. S. Aisen, B. De Strooper, N. C. Fox, C. A. Lemere, J. M. Ringman, S. Salloway, R. A. Sperling, M. Windisch and C. Xiong (2011). "Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease." Alzheimers Res Ther **3**(1): 1.
- Beasley, S. J. and J. M. Greer (2015). "Autoantibodies and their potential roles in diseases of the nervous system." Clinical and Experimental Neuroimmunology **6**(4): 370-386.
- Beaulieu, J. M., J. Robertson and J. P. Julien (1999). "Interactions between peripherin and neurofilaments in cultured cells: disruption of peripherin assembly by the NF-M and NF-H subunits." Biochem Cell Biol **77**(1): 41-45.
- Bernier-Valentin, F., R. Rabilloud and B. Rousset (1988). "Evidence for anti-tubulin autoantibodies in the form of immune complexes in human sera." Clin Exp Immunol **71**(2): 261-268.
- Bhan, A., C. Jacobsen, K. M. Myhr, I. Dalen, K. Lode and E. Farbu (2018). "Neurofilaments and 10-year follow-up in multiple sclerosis." Mult Scler **24**(10): 1301-1307.
- Bingley, P. J., E. Bonifacio, A. J. Williams, S. Genovese, G. F. Bottazzo and E. A. Gale (1997). "Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers." Diabetes **46**(11): 1701-1710.
- Boxus, M., L. Lockman, M. Fochesato, C. Lorin, F. Thomas and S. L. Giannini (2014). "Antibody avidity measurements in recipients of Cervarix vaccine following a two-dose schedule or a three-dose schedule." Vaccine **32**(26): 3232-3236.
- Bozic, B., S. Cucnik, T. Kveder and B. Rozman (2005). "Avidity of anti-beta-2-glycoprotein I antibodies." Autoimmun Rev **4**(5): 303-308.
- Bridel, C., W. N. van Wieringen, H. Zetterberg, B. M. Tijms, C. E. Teunissen, N. F. L. G. and the, J. C. Alvarez-Cermeno, U. Andreasson, M. Axelsson, D. C. Backstrom, A. Bartos, M. Bjerke, K. Blennow, A. Boxer, L. Brundin, J. Burman, T. Christensen, L. Fialova, L. Forsgren, J. L. Frederiksen, M. Gisslen, E. Gray, M. Gunnarsson, S. Hall, O. Hansson, M. K. Herbert, J. Jakobsson, J. Jessen-Krut, S. Janelidze, G. Johannsson, M. Jonsson, L. Kappos, M. Khademi, M. Khalil, J. Kuhle, M. Landen, V. Leinonen, G. Logroscino, C. H. Lu, J. Lycke, N. K. Magdalinou, A. Malaspina, N. Mattsson, L. H. Meeter, S. R. Mehta, S. Modvig, T. Olsson, R. W. Paterson, J. Perez-Santiago, F. Piehl, Y. A. L. Pijnenburg, O. T. Pyykko, O. Ragnarsson, J. C. Rojas, J. Romme Christensen, L. Sandberg, C. S. Scherling, J. M. Schott, F. T. Sellebjerg, I. L. Simone, T. Skillback, M. Stilund, P. Sundstrom, A. Svenningsson, R. Tortelli, C. Tortorella, A. Trentini, M. Troiano, M. R. Turner, J. C. van Swieten, M. Vagberg, M. M. Verbeek, L. M. Villar, P. J. Visser, A. Wallin, A. Weiss, C. Wikkelso and E. J. Wild

(2019). "Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein in Neurology: A Systematic Review and Meta-analysis." JAMA Neurol **76**(9): 1035-1048.

Brown, H. G., J. C. Troncoso and J. H. Hoh (1998). "Neurofilament-L homopolymers are less mechanically stable than native neurofilaments." J Microsc **191**(3): 229-237.

Camara-Lemarroy, C., L. Metz, J. Kuhle, D. Leppert, E. Willemsen, D. K. Li, A. Traboulsee, J. Greenfield, G. Cerchiaro, C. Silva and V. W. Yong (2022). "Minocycline treatment in clinically isolated syndrome and serum NfL, GFAP, and metalloproteinase levels." Mult Scler **28**(13): 2081-2089.

Cao, Z., J. Lv and W. Quan (2010). "Low avidity and level of serum anti-Aβ antibodies in patients with cerebral amyloid angiopathy-related cerebral hemorrhage." Int J Neurosci **120**(12): 760-764.

Cohlberg, J. A., H. Hajarian, T. Tran, P. Alipourjedi and A. Noveen (1995). "Neurofilament protein heterotetramers as assembly intermediates." J Biol Chem **270**(16): 9334-9339.

Colasanti, T., C. Barbatì, G. Rosano, W. Malorni and E. Ortona (2010). "Autoantibodies in patients with Alzheimer's disease: pathogenetic role and potential use as biomarkers of disease progression." Autoimmun Rev **9**(12): 807-811.

Cucnik, S., B. Božić, T. Kveder, M. Tomsic and B. Rozman (2005). "Avidity of anti-β2-glycoprotein I and thrombosis or pregnancy loss in patients with antiphospholipid syndrome." Ann N Y Acad Sci **1051**: 141-147.

Cucnik, S., T. Kveder, A. Artenjak, Z. Ulcova Gallova, J. Swadzba, J. Musial, T. Iwaniec, L. Stojanovich, C. Alessandri, G. Valesini, T. Avčin, J. W. Cohen Tervaert, B. Rozman and B. Božić (2012). "Avidity of anti-β2-glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome." Lupus **21**(7): 764-765.

Cucnik, S., T. Kveder, I. Krizaj, B. Rozman and B. Božić (2004). "High avidity anti-β2-glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome." Ann Rheum Dis **63**(11): 1478-1482.

Cucnik, S., T. Kveder, Z. Ulcova-Gallova, J. Swadzba, J. Musial, G. Valesini, T. Avčin, B. Rozman and B. Božić (2011). "The avidity of anti-β2-glycoprotein I antibodies in patients with or without antiphospholipid syndrome: a collaborative study in the frame of the European forum on antiphospholipid antibodies." Lupus **20**(11): 1166-1171.

Dauner, J. G., Y. Pan, A. Hildesheim, T. J. Kemp, C. Porras and L. A. Pinto (2012). "Development and application of a GuHCl-modified ELISA to measure the avidity of anti-HPV L1 VLP antibodies in vaccinated individuals." Mol Cell Probes **26**(2): 73-80.

de Jong, D., R. W. Jansen, Y. A. Pijnenburg, W. J. van Geel, G. F. Borm, H. P. Kremer and M. M. Verbeek (2007). "CSF neurofilament proteins in the differential diagnosis of dementia." J Neurol Neurosurg Psychiatry **78**(9): 936-938.

Deek, J., P. J. Chung and C. R. Safinya (2016). "Neurofilament networks: Salt-responsive hydrogels with sidearm-dependent phase behavior." Biochim Biophys Acta **1860**(7): 1560-1569.

Dimitrov, J. D., S. Lacroix-Desmazes and S. V. Kaveri (2011). "Important parameters for evaluation of antibody avidity by immunosorbent assay." Anal Biochem **418**(1): 149-151.

Dobson, R. and G. Giovannoni (2019). "Multiple sclerosis - a review." Eur J Neurol **26**(1): 27-40.

Dodel, R. C., Y. Du, C. Depboylu, H. Hampel, L. Frolich, A. Haag, U. Hemmeter, S. Paulsen, S. J. Teipel, S. Brettschneider, A. Spottke, C. Nolker, H. J. Moller, X. Wei, M. Farlow, N. Sommer and W. H. Oertel (2004). "Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **75**(10): 1472-1474.

Dubois, B., H. H. Feldman, C. Jacova, S. T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, J. Cummings, A. Delacourte, D. Galasko, S. Gauthier, G. Jicha, K. Meguro, J. O'Brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, Y. Stern, P. J. Visser and P. Scheltens (2007). "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria." Lancet Neurol **6**(8): 734-746.

Elder, G. A., V. L. Friedrich, Jr., P. Bosco, C. Kang, A. Gourov, P. H. Tu, V. M. Lee and R. A. Lazzarini (1998). "Absence of the mid-sized neurofilament subunit decreases axonal calibers, levels of light neurofilament (NF-L), and neurofilament content." J Cell Biol **141**(3): 727-739.

Elder, G. A., V. L. Friedrich, Jr., C. Kang, P. Bosco, A. Gourov, P. H. Tu, B. Zhang, V. M. Lee and R. A. Lazzarini (1998). "Requirement of heavy neurofilament subunit in the development of axons with large calibers." J Cell Biol **143**(1): 195-205.

Fialova, L., A. Bartos, J. Svarcova, D. Zimova, J. Kotoucova and I. Malbohan (2013). "Serum and cerebrospinal fluid light neurofilaments and antibodies against them in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis." J Neuroimmunol **262**(1-2): 113-120.

Fialová, L., L. Nosková, M. Kalousová, T. Zima, T. Uher and A. Bartoš (2022). "Analytical and pre-analytical aspects of neurofilament light chain determination in biological fluids." Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie **85/118**(1).

- Fialova, L., J. Svarcova, A. Bartos and I. Malbohan (2012). "Avidity of anti-neurocytoskeletal antibodies in cerebrospinal fluid and serum." Folia Microbiol (Praha) **57**(5): 415-419.
- Friedova, L., J. Motyl, B. Srpova, J. Oechtering, C. Barro, K. Vodehnalova, M. Andelova, L. Noskova, L. Fialova, E. K. Havrdova, D. Horakova, R. H. Benedict, J. Kuhle and T. Uher (2020). "The weak association between neurofilament levels at multiple sclerosis onset and cognitive performance after 9 years." Mult Scler Relat Disord **46**: 102534.
- Gaiottino, J., N. Norgren, R. Dobson, J. Topping, A. Nissim, A. Malaspina, J. P. Bestwick, A. U. Monsch, A. Regeniter, R. L. Lindberg, L. Kappos, D. Leppert, A. Petzold, G. Giovannoni and J. Kuhle (2013). "Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases." PLoS One **8**(9): e75091.
- Gassmann, C. and G. Bauer (1997). "Avidity determination of IgG directed against tick-borne encephalitis virus improves detection of current infections." J Med Virol **51**(3): 242-251.
- Gentil, B. J., M. Tibshirani and H. D. Durham (2015). "Neurofilament dynamics and involvement in neurological disorders." Cell Tissue Res **360**(3): 609-620.
- Gharavi, A. R., H. (1996). Affinity and avidity of autoantibodies. Autoantibodies. J. S. Peter, Y.; . Amsterdam, Elsevier: 13-23.
- Giasson, B. I. and W. E. Mushynski (1997). "Study of proline-directed protein kinases involved in phosphorylation of the heavy neurofilament subunit." J Neurosci **17**(24): 9466-9472.
- Gilhus, N. E., G. O. Skeie, F. Romi, K. Lazaridis, P. Zisimopoulou and S. Tzartos (2016). "Myasthenia gravis - autoantibody characteristics and their implications for therapy." Nat Rev Neurol **12**(5): 259-268.
- Gnanapavan, S., D. Grant, S. Morant, J. Furby, T. Hayton, C. E. Teunissen, V. Leoni, M. Marta, R. Brenner, J. Palace, D. H. Miller, R. Kapoor and G. Giovannoni (2013). "Biomarker report from the phase II lamotrigine trial in secondary progressive MS - neurofilament as a surrogate of disease progression." PLoS One **8**(8): e70019.
- Golda, R., Z. Wolski, M. Wyszomirska-Golda, K. Madalinski and J. Michalkiewicz (2004). "The presence and structure of circulating immune complexes in patients with prostate tumors." Med Sci Monit **10**(3): CR123-127.
- Guidato, S., L. H. Tsai, J. Woodgett and C. C. Miller (1996). "Differential cellular phosphorylation of neurofilament heavy side-arms by glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinase-5." J Neurochem **66**(4): 1698-1706.

Hakansson, I., A. Tisell, P. Cassel, K. Blennow, H. Zetterberg, P. Lundberg, C. Dahle, M. Vrethem and J. Ernerudh (2017). "Neurofilament light chain in cerebrospinal fluid and prediction of disease activity in clinically isolated syndrome and relapsing-remitting multiple sclerosis." Eur J Neurol **24**(5): 703-712.

Hayakawa, K., M. Asano, S. A. Shinton, M. Gui, D. Allman, C. L. Stewart, J. Silver and R. R. Hardy (1999). "Positive selection of natural autoreactive B cells." Science **285**(5424): 113-116.

Herrmann, H. and U. Aebi (2004). "Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds." Annu Rev Biochem **73**: 749-789.

Hoglund, K., A. Bogstedt, S. Fabre, A. Aziz, P. Annas, H. Basun, L. Minthon, L. Lannfelt, K. Blennow and N. Andreasen (2012). "Longitudinal stability evaluation of biomarkers and their correlation in cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **32**(4): 939-947.

Hromadkova, L., M. Kolarova, B. Jankovicova, A. Bartos, J. Ricny, Z. Bilkova and D. Ripova (2015). "Identification and characterization of natural antibodies against tau protein in an intravenous immunoglobulin product." J Neuroimmunol **289**: 121-129.

Jack, C. R., Jr., D. A. Bennett, K. Blennow, M. C. Carrillo, H. H. Feldman, G. B. Frisoni, H. Hampel, W. J. Jagust, K. A. Johnson, D. S. Knopman, R. C. Petersen, P. Scheltens, R. A. Sperling and B. Dubois (2016). "A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers." Neurology **87**(5): 539-547.

Jianping, L., Y. Zhibing, Q. Wei, C. Zhikai, X. Jie and L. Jinbiao (2006). "Low avidity and level of serum anti-Abeta antibodies in Alzheimer disease." Alzheimer Dis Assoc Disord **20**(3): 127-132.

Julien, J. P. and W. E. Mushynski (1983). "The distribution of phosphorylation sites among identified proteolytic fragments of mammalian neurofilaments." J Biol Chem **258**(6): 4019-4025.

Khalil, M., C. E. Teunissen, M. Otto, F. Piehl, M. P. Sormani, T. Gattringer, C. Barro, L. Kappos, M. Comabella, F. Fazekas, A. Petzold, K. Blennow, H. Zetterberg and J. Kuhle (2018). "Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders." Nat Rev Neurol **14**(10): 577-589.

Kile, S., W. Au, C. Parise, K. Rose, T. Donnel, A. Hankins, M. Chan and A. Ghassemi (2017). "IVIG treatment of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: a randomised double-blinded exploratory study of the effect on brain atrophy, cognition and conversion to dementia." J Neurol Neurosurg Psychiatry **88**(2): 106-112.

Klaver, A. C., M. P. Coffey, D. A. Bennett and D. A. Loeffler (2017). "Specific serum antibody binding to phosphorylated and non-phosphorylated tau in non-cognitively

impaired, mildly cognitively impaired, and Alzheimer's disease subjects: an exploratory study." Transl Neurodegener **6**: 32.

Koneczny, I., J. Cossins, P. Waters, D. Beeson and A. Vincent (2013). "MuSK myasthenia gravis IgG4 disrupts the interaction of LRP4 with MuSK but both IgG4 and IgG1-3 can disperse preformed agrin-independent AChR clusters." PLoS One **8**(11): e80695.

Krestova, M., J. Ricny and A. Bartos (2018). "Changes in concentrations of tau-reactive antibodies are dependent on sex in Alzheimer's disease patients." J Neuroimmunol **322**: 1-8.

Kuhle, J., C. Barro, U. Andreasson, T. Derfuss, R. Lindberg, A. Sandelius, V. Liman, N. Norgren, K. Blennow and H. Zetterberg (2016). "Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa." Clin Chem Lab Med **54**(10): 1655-1661.

Kuhle, J., D. Leppert, A. Petzold, A. Regeniter, C. Schindler, M. Mehling, D. C. Anthony, L. Kappos and R. L. Lindberg (2011). "Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis." Neurology **76**(14): 1206-1213.

Lancaster, E. and J. Dalmau (2012). "Neuronal autoantigens--pathogenesis, associated disorders and antibody testing." Nat Rev Neurol **8**(7): 380-390.

Lane, C. A., J. Hardy and J. M. Schott (2018). "Alzheimer's disease." Eur J Neurol **25**(1): 59-70.

Leger, J. M., R. Guimaraes-Costa and R. Iancu Ferfoggia (2015). "The pathogenesis of multifocal motor neuropathy and an update on current management options." Ther Adv Neurol Disord **8**(3): 109-122.

Leite, M. I., S. Jacob, S. Viegas, J. Cossins, L. Clover, B. P. Morgan, D. Beeson, N. Willcox and A. Vincent (2008). "IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis." Brain **131**(Pt 7): 1940-1952.

Lennon, V. A., T. J. Kryzer, S. J. Pittock, A. S. Verkman and S. R. Hinson (2005). "IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel." J Exp Med **202**(4): 473-477.

Leslie, R. D., M. A. Atkinson and A. L. Notkins (1999). "Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes." Diabetologia **42**(1): 3-14.

Levy, M., B. Wildemann, S. Jarius, B. Orellano, S. Sasidharan, M. S. Weber and O. Stuve (2014). "Immunopathogenesis of neuromyelitis optica." Adv Immunol **121**: 213-242.

Li, X., W. Koudstaal, L. Fletcher, M. Costa, M. van Winsen, B. Siregar, H. Inganas, J. Kim, E. Keogh, J. Macedo, T. Holland, S. Perry, F. Bard, J. J. Hoozemans, J. Goudsmit, A. Apetri and G. Pascual (2019). "Naturally occurring antibodies isolated from PD patients inhibit synuclein seeding in vitro and recognize Lewy pathology." Acta Neuropathol **137**(5): 825-836.

Ljubisavljevic, S., I. Stojanovic, J. Basic and D. A. Pavlovic (2016). "The Validation Study of Neurofilament Heavy Chain and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as Plasma Biomarkers of Clinical/Paraclinical Activity in First and Relapsing-Remitting Demyelination Acute Attacks." Neurotox Res **30**(3): 530-538.

Lublin, F. D., S. C. Reingold, J. A. Cohen, G. R. Cutter, P. S. Sorensen, A. J. Thompson, J. S. Wolinsky, L. J. Balcer, B. Banwell, F. Barkhof, B. Bebo, Jr., P. A. Calabresi, M. Clanet, G. Comi, R. J. Fox, M. S. Freedman, A. D. Goodman, M. Inglese, L. Kappos, B. C. Kieseier, J. A. Lincoln, C. Lubetzki, A. E. Miller, X. Montalban, P. W. O'Connor, J. Petkau, C. Pozzilli, R. A. Rudick, M. P. Sormani, O. Stuve, E. Waubant and C. H. Polman (2014). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions." Neurology **83**(3): 278-286.

Lutz, H. U. (2007). "Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview." J Autoimmun **29**(4): 287-294.

Lutz, H. U., C. J. Binder and S. Kaveri (2009). "Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease." Trends Immunol **30**(1): 43-51.

Lycke, J. N., J. E. Karlsson, O. Andersen and L. E. Rosengren (1998). "Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **64**(3): 402-404.

Maftei, M., F. Thurm, V. M. Leirer, C. A. von Arnim, T. Elbert, M. Przybylski, I. T. Kolassa and M. Manea (2012). "Antigen-bound and free beta-amyloid autoantibodies in serum of healthy adults." PLoS One **7**(9): e44516.

Maftei, M., F. Thurm, C. Schnack, H. Tumani, M. Otto, T. Elbert, I. T. Kolassa, M. Przybylski, M. Manea and C. A. von Arnim (2013). "Increased levels of antigen-bound beta-amyloid autoantibodies in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients." PLoS One **8**(7): e68996.

Martinez-Flores, J. A., M. Serrano, D. Perez, D. Lora, E. Paz-Artal, J. M. Morales and A. Serrano (2015). "Detection of circulating immune complexes of human IgA and beta 2 glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome symptomatology." J Immunol Methods **422**: 51-58.

Martinez-Morillo, E., C. Childs, B. P. Garcia, F. V. Alvarez Menendez, A. D. Romaschin, G. Cervellin, G. Lippi and E. P. Diamandis (2015). "Neurofilament medium

polypeptide (NFM) protein concentration is increased in CSF and serum samples from patients with brain injury." Clin Chem Lab Med **53**(10): 1575-1584.

McComb, M., M. Krikheli, T. Uher, R. W. Browne, B. Srpova, J. Oechtering, A. M. Maceski, M. Tyblova, D. Jakimovski, D. P. Ramasamy, N. Bergsland, J. Krasensky, L. Noskova, L. Fialova, B. Weinstock-Guttman, E. K. Havrdova, M. Vaneckova, R. Zivadinov, D. Horakova, J. Kuhle and M. Ramanathan (2020). "Neuroprotective associations of apolipoproteins A-I and A-II with neurofilament levels in early multiple sclerosis." J Clin Lipidol **14**(5): 675-684 e672.

McKhann, G. M., D. S. Knopman, H. Chertkow, B. T. Hyman, C. R. Jack, Jr., C. H. Kawas, W. E. Klunk, W. J. Koroshetz, J. J. Manly, R. Mayeux, R. C. Mohs, J. C. Morris, M. N. Rossor, P. Scheltens, M. C. Carrillo, B. Thies, S. Weintraub and C. H. Phelps (2011). "The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **7**(3): 263-269.

Merbl, Y., M. Zucker-Toledano, F. J. Quintana and I. R. Cohen (2007). "Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics." J Clin Invest **117**(3): 712-718.

Monsalvo, A. C., J. P. Batalle, M. F. Lopez, J. C. Krause, J. Klemenc, J. Z. Hernandez, B. Maskin, J. Bugna, C. Rubinstein, L. Aguilar, L. Dalurzo, R. Libster, V. Savy, E. Baumeister, L. Aguilar, G. Cabral, J. Font, L. Solari, K. P. Weller, J. Johnson, M. Echavarria, K. M. Edwards, J. D. Chappell, J. E. Crowe, Jr., J. V. Williams, G. A. Melendi and F. P. Polack (2011). "Severe pandemic 2009 H1N1 influenza disease due to pathogenic immune complexes." Nat Med **17**(2): 195-199.

Neff, F., X. Wei, C. Nolker, M. Bacher, Y. Du and R. Dodel (2008). "Immunotherapy and naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative disorders." Autoimmun Rev **7**(6): 501-507.

O'Nuallain, B., R. Hrnčić, J. S. Wall, D. T. Weiss and A. Solomon (2006). "Diagnostic and therapeutic potential of amyloid-reactive IgG antibodies contained in human sera." J Immunol **176**(11): 7071-7078.

Olsson, B., E. Portelius, N. C. Cullen, A. Sandelius, H. Zetterberg, U. Andreasson, K. Hoglund, D. J. Irwin, M. Grossman, D. Weintraub, A. Chen-Plotkin, D. Wolk, L. McCluskey, L. Elman, L. M. Shaw, J. B. Toledo, J. McBride, P. Hernandez-Con, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski and K. Blennow (2019). "Association of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein Levels With Cognition in Patients With Dementia, Motor Neuron Disease, and Movement Disorders." JAMA Neurol **76**(3): 318-325.

Pant, H. C. and Veeranna (1995). "Neurofilament phosphorylation." Biochem Cell Biol **73**(9-10): 575-592.



- Perez, D., L. Stojanovich, L. Naranjo, N. Stanisavljevic, G. Bogdanovic, M. Serrano and A. Serrano (2018). "Presence of Immune Complexes of IgG/IgM Bound to B2-glycoprotein I Is Associated With Non-criteria Clinical Manifestations in Patients With Antiphospholipid Syndrome." Front Immunol **9**: 2644.
- Perrot, R. and J. Eyer (2009). "Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders." Brain Res Bull **80**(4-5): 282-295.
- Pijnenburg, Y. A., J. C. Janssen, N. S. Schoonenboom, A. Petzold, C. Mulder, T. Stigbrand, N. Norgren, H. Heijst, C. E. Hack, P. Scheltens and C. E. Teunissen (2007). "CSF neurofilaments in frontotemporal dementia compared with early onset Alzheimer's disease and controls." Dement Geriatr Cogn Disord **23**(4): 225-230.
- Pijnenburg, Y. A., N. A. Verwey, W. M. van der Flier, P. Scheltens and C. E. Teunissen (2015). "Discriminative and prognostic potential of cerebrospinal fluid phosphoTau/tau ratio and neurofilaments for frontotemporal dementia subtypes." Alzheimers Dement (Amst) **1**(4): 505-512.
- Puentes, F., P. Benkert, S. Amor, J. Kuhle and G. Giovannoni (2021). "Antibodies to neurofilament light as potential biomarkers in multiple sclerosis." BMJ Neurol Open **3**(2): e000192.
- Puentes, F., V. Lombardi, C. H. Lu, O. Yildiz, P. Fratta, A. Isaacs, Y. Bobeva, J. Wu, A. L. S. B. Consortium, C. R. Consortium, M. Benatar and A. Malaspina (2021). "Humoral response to neurofilaments and dipeptide repeats in ALS progression." Ann Clin Transl Neurol **8**(9): 1831-1844.
- Puentes, F., B. J. van der Star, S. D. Boomkamp, M. Kipp, L. Boon, I. Bosca, J. Raffel, S. Gnanapavan, P. van der Valk, J. Stephenson, S. C. Barnett, D. Baker and S. Amor (2017). "Neurofilament light as an immune target for pathogenic antibodies." Immunology **152**(4): 580-588.
- Pullen, G. R., M. G. Fitzgerald and C. S. Hosking (1986). "Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution." J Immunol Methods **86**(1): 83-87.
- Reindl, M., F. Di Pauli, K. Rostasy and T. Berger (2013). "The spectrum of MOG autoantibody-associated demyelinating diseases." Nat Rev Neurol **9**(8): 455-461.
- Rosengren, L. E., J. E. Karlsson, J. O. Karlsson, L. I. Persson and C. Wikkelso (1996). "Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF." J Neurochem **67**(5): 2013-2018.
- Sadaba, M. C., J. Tzartos, C. Paino, M. Garcia-Villanueva, J. C. Alvarez-Cermeno, L. M. Villar and M. M. Esiri (2012). "Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions." J Neuroimmunol **247**(1-2): 86-94.

- Schlosser, M., K. Koczwara, H. Kenk, M. Strebelow, I. Rjasanowski, R. Wassmuth, P. Achenbach, A. G. Ziegler and E. Bonifacio (2005). "In insulin-autoantibody-positive children from the general population, antibody affinity identifies those at high and low risk." Diabetologia **48**(9): 1830-1832.
- Silber, E., Y. K. Semra, N. A. Gregson and M. K. Sharief (2002). "Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit." Neurology **58**(9): 1372-1381.
- Sjogren, M., L. Rosengren, L. Minthon, P. Davidsson, K. Blennow and A. Wallin (2000). "Cytoskeleton proteins in CSF distinguish frontotemporal dementia from AD." Neurology **54**(10): 1960-1964.
- Srpova, B., T. Uher, T. Hrciarova, C. Barro, M. Andelova, Z. Michalak, M. Vaneckova, J. Krasensky, L. Noskova, E. K. Havrdova, J. Kuhle and D. Horakova (2021). "Serum neurofilament light chain reflects inflammation-driven neurodegeneration and predicts delayed brain volume loss in early stage of multiple sclerosis." Mult Scler **27**(1): 52-60.
- Szaro, B. G. and M. J. Strong (2010). "Post-transcriptional control of neurofilaments: New roles in development, regeneration and neurodegenerative disease." Trends Neurosci **33**(1): 27-37.
- Teunissen, C., T. Menge, A. Altintas, J. C. Alvarez-Cermeno, A. Bertolotto, F. S. Berven, L. Brundin, M. Comabella, M. Degen, F. Deisenhammer, F. Fazekas, D. Franciotta, J. L. Frederiksen, D. Galimberti, S. Gnanapavan, H. Hegen, B. Hemmer, R. Hintzen, S. Hughes, E. Iacobaeus, A. C. Kroksveen, J. Kuhle, J. Richert, H. Tumani, L. M. Villar, J. Drulovic, I. Dujmovic, M. Khalil and A. Bartos (2013). "Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarker studies in multiple sclerosis." Mult Scler **19**(13): 1802-1809.
- Teunissen, C. E., E. Iacobaeus, M. Khademi, L. Brundin, N. Norgren, M. J. Koel-Simmelink, M. Schepens, F. Bouwman, H. A. Twaalfhoven, H. J. Blom, C. Jakobs and C. D. Dijkstra (2009). "Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis." Neurology **72**(15): 1322-1329.
- Tsutsui, K., T. Kanbayashi, K. Tanaka, S. Boku, W. Ito, J. Tokunaga, A. Mori, Y. Hishikawa, T. Shimizu and S. Nishino (2012). "Anti-NMDA-receptor antibody detected in encephalitis, schizophrenia, and narcolepsy with psychotic features." BMC Psychiatry **12**: 37.
- Uher, T., E. K. Havrdova, P. Benkert, N. Bergsland, J. Krasensky, B. Srpova, M. Dwyer, M. Tyblova, S. Meier, M. Vaneckova, D. Horakova, R. Zivadinov, D. Leppert, T. Kalincik and J. Kuhle (2021). "Measurement of neurofilaments improves stratification of future disease activity in early multiple sclerosis." Mult Scler **27**(13): 2001-2013.

Uher, T., S. Schaedelin, B. Srpova, C. Barro, N. Bergsland, M. Dwyer, M. Tyblova, K. Vodehnalova, P. Benkert, J. Oechtering, D. Leppert, Y. Naegelin, J. Krasensky, M. Vaneckova, E. Kubala Havrdova, L. Kappos, R. Zivadinov, D. Horakova, J. Kuhle and T. Kalincik (2020). "Monitoring of radiologic disease activity by serum neurofilaments in MS." Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm **7**(4).

van Ameijde, J., R. Crespo, R. Janson, J. Juraszek, B. Siregar, H. Verveen, I. Sprengers, T. Nahar, J. J. Hoozemans, S. Steinbacher, R. Willems, L. Delbroek, M. Borgers, K. Dockx, K. Van Kolen, M. Mercken, G. Pascual, W. Koudstaal and A. Apetri (2018). "Enhancement of therapeutic potential of a naturally occurring human antibody targeting a phosphorylated Ser(422) containing epitope on pathological tau." Acta Neuropathol Commun **6**(1): 59.

Veeranna, N. D. Amin, N. G. Ahn, H. Jaffe, C. A. Winters, P. Grant and H. C. Pant (1998). "Mitogen-activated protein kinases (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M." J Neurosci **18**(11): 4008-4021.

Veeranna, K. T. Shetty, W. T. Link, H. Jaffe, J. Wang and H. C. Pant (1995). "Neuronal cyclin-dependent kinase-5 phosphorylation sites in neurofilament protein (NF-H) are dephosphorylated by protein phosphatase 2A." J Neurochem **64**(6): 2681-2690.

Verberk, I. M. W., M. Koel-Simmelink, H. Twaalfhoven, H. Vrenken, C. Korth, J. Killestein, C. E. Teunissen and C. Bridel (2021). "Ultrasensitive immunoassay allows measurement of serum neurofilament heavy in multiple sclerosis." Mult Scler Relat Disord **50**: 102840.

Waters, P. J., A. McKeon, M. I. Leite, S. Rajasekharan, V. A. Lennon, A. Villalobos, J. Palace, J. N. Mandrekar, A. Vincent, A. Bar-Or and S. J. Pittock (2012). "Serologic diagnosis of NMO: a multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays." Neurology **78**(9): 665-671; discussion 669.

<https://www.wikiskripta.eu/w/Protíl%C3%A1tka>; zří 2022

Woznicova, V. (2004). "[Immunoglobulin G avidity in infectious diseases]." Epidemiol Mikrobiol Imunol **53**(1): 4-11.

Yuan, A., M. V. Rao, T. Sasaki, Y. Chen, A. Kumar, Veeranna, R. K. Liem, J. Eyer, A. C. Peterson, J. P. Julien and R. A. Nixon (2006). "Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS." J Neurosci **26**(39): 10006-10019.

Yuan, A., M. V. Rao, Veeranna and R. A. Nixon (2012). "Neurofilaments at a glance." J Cell Sci **125**(Pt 14): 3257-3263.

Yuan, A., T. Sasaki, A. Kumar, C. M. Peterhoff, M. V. Rao, R. K. Liem, J. P. Julien and R. A. Nixon (2012). "Peripherin is a subunit of peripheral nerve neurofilaments:

implications for differential vulnerability of CNS and peripheral nervous system axons." J Neurosci **32**(25): 8501-8508.

Zetterberg, H. and K. Blennow (2021). "Moving fluid biomarkers for Alzheimer's disease from research tools to routine clinical diagnostics." Mol Neurodegener **16**(1): 10.

Zhou, W., J. Zhang, F. Ye, G. Xu, H. Su, Y. Su, X. Zhang and I. Alzheimer's Disease Neuroimaging (2017). "Plasma neurofilament light chain levels in Alzheimer's disease." Neurosci Lett **650**: 60-64.

Zhu, Q., S. Couillard-Despres and J. P. Julien (1997). "Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments." Exp Neurol **148**(1): 299-316.

Zima, T. (2013). Laboratorní diagnostika. Praha, Galén.

## 8. Seznam publikací

1) Publikace, které jsou podkladem disertace:

a) *s IF*

- Noskova L, Fialova L, Bartos A, Zima T. Avidity of antineurocytoskeletal antibodies in Alzheimer's disease patients. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2017 Jun;161(2):179-186. doi: 10.5507/bp.2017.017. Epub 2017 Apr 26. PMID: 28452379. **IF = 1,648**
- Fialová L.; Nosková L.; Kalousová M.; Zima T.; Uher T.; Bartoš A. Analytické a preanalytické aspekty stanovení lehkých řetězců neurofilament v biologických tekutinách. Cesk Slov Neurol N 2022; 85(1): 11-16 **IF = 0,411**
- McComb M, Krikheli M, Uher T, Browne RW, Srpova B, Oechtering J, Maceski AM, Tyblova M, Jakimovski D, Ramasamy DP, Bergsland N, Krasensky J, Noskova L, Fialova L, Weinstock-Guttman B, Havrdova EK, Vaneckova M, Zivadinov R, Horakova D, Kuhle J, Ramanathan M. Neuroprotective associations of apolipoproteins A-I and A-II with neurofilament levels in early multiple sclerosis. J Clin Lipidol. 2020 Sep-Oct;14(5):675-684.e2. doi: 10.1016/j.jacl.2020.07.001. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32758395. **IF = 5.365**
- Friedova L, Motyl J, Srpova B, Oechtering J, Barro C, Vodehnalova K, Andelova M, Noskova L, Fialová L, Havrdova EK, Horakova D, Benedict RH, Kuhle J, Uher T. The weak association between neurofilament levels at multiple sclerosis onset and cognitive performance after 9 years. Mult Scler Relat Disord. 2020 Nov;46:102534. doi: 10.1016/j.msard.2020.102534. Epub 2020 Sep 28. PMID: 33032055. **IF = 4.808**

b) *bez IF*

Abstrakta:

- Noskova L., Fialova L., Bartos A. Antineurocytoskeletal antibodies and their immune complexes in patients with neurodegenerative diseases. FEBS OPEN BIO Volume: 8 Supplement: 1 Pages: 257 July 2018

- Nosková L., Fialová L., Bartoš A. Protilátky proti neurofilamentům u pacientů s neurodegenerativním onemocněním. *Cesk Slov Neurol N* 2019; 82: 115 Supplementum 2

2) Publikace, bez vztahu k disertaci:

a) s IF

- Srpova B, Uher T, Hrnčiarova T, Barro C, Andelova M, Michalak Z, Vaneckova M, Krasensky J, Noskova L, Havrdova EK, Kuhle J, Horakova D. Serum neurofilament light chain reflects inflammation-driven neurodegeneration and predicts delayed brain volume loss in early stage of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2021 Jan;27(1):52-60. doi: 10.1177/1352458519901272. Epub 2020 Jan 21. PMID: 31961243. **IF = 5,855**
- Nosková L, Kubíčková B, Vašková L, Bláhová B, Wimmerová M, Stiborová M, Hodek P. Fluorescent cellular assay for screening agents inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence. *Sensors (Basel).* 2015 Jan 16;15(1):1945-53. doi: 10.3390/s150101945. PMID: 25602268; PMCID: PMC4327110. **IF = 3.847**
- Kubickova B, Majerova B, Hadrabova J, Noskova L, Stiborova M, Hodek P. Effect of chicken antibodies on inflammation in human lung epithelial cell lines. *Neuro Endocrinol Lett.* 2014;35 Suppl 2:99-104. PMID: 25638373. **IF = 0.765**
- Kuchar O, Petrackova M, Kalousova M, Noskova L, Zima T, Fialova L. Levels and avidities of antiphosphatidylethanolamine antibodies in patients with thrombotic events and immunologically-mediated diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2022 Feb 11. doi: 10.5507/bp.2022.003. Epub ahead of print. PMID: 35147138. **IF = 1,648**

- Vašková, L., Nosková, L., Bláhová, B., Wimmerová, M., Dřevínek, P., Kubíčková, B., Stiborová, M., Hodek, P.; Evaluation of anti-PAIIL lectin hen yolk antibody as an agent inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells. *Monatsh. Chem.*147, 889-896 (2016).

**IF = 1.613**

- A. Bartoš, M. Smětáková, J. Říčný, L. Nosková, L. Fialová: Možnosti stanovení likvorového tripletu tau proteinů a  $\beta$ -amyloidu 42 metodami ELISA a orientační normativní vodítka. *Cesk Slov Ne urol N* 2019; 82/ 115(5): 533– 540

**IF = 0,411**

## 9. Seznam příloh

**Příloha 1** – Noskova L, Fialova L, Bartos A, Zima T. Avidity of antineurocytoskeletal antibodies in Alzheimer's disease patients. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2017 Jun;161(2):179-186. doi: 10.5507/bp.2017.017. Epub 2017 Apr 26. PMID: 28452379.

**Příloha 2** – Fialová L.; Nosková L.; Kalousová M.; Zima T.; Uher T.; Bartoš A. Analytické a preanalytické aspekty stanovení lehkých řetězců neurofilament v biologických tekutinách. *Cesk Slov Neurol N* 2022; 85(1): 11-16

**Příloha 3** – McComb M, Krikheli M, Uher T, Browne RW, Srpova B, Oechtering J, Maceski AM, Tyblova M, Jakimovski D, Ramasamy DP, Bergsland N, Krasensky J, Noskova L, Fialova L, Weinstock-Guttman B, Havrdova EK, Vaneckova M, Zivadinov R, Horakova D, Kuhle J, Ramanathan M. Neuroprotective associations of apolipoproteins A-I and A-II with neurofilament levels in early multiple sclerosis. *J Clin Lipidol.* 2020 Sep-Oct;14(5):675-684.e2. doi: 10.1016/j.jacl.2020.07.001. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32758395.

**Příloha 4** – Friedova L, Motyl J, Srpova B, Oechtering J, Barro C, Vodehnalova K, Andelova M, Noskova L, Fialová L, Havrdova EK, Horakova D, Benedict RH, Kuhle J, Uher T. The weak association between neurofilament levels at multiple sclerosis onset and cognitive performance after 9 years. *Mult Scler Relat Disord.* 2020 Nov;46:102534. doi: 10.1016/j.msard.2020.102534. Epub 2020 Sep 28. PMID: 33032055.

**Příloha 5** – Noskova L., Fialova L., Bartos A. Antineurocytoskeletal antibodies and their immune complexes in patients with neurodegenerative diseases. *FEBS OPEN BIO* Volume: 8 Supplement: 1 Pages: 257 July 2018

**Příloha 6** – Nosková L., Fialová L., Bartoš A. Protilátky proti neurofilamentům u pacientů s neurodegenerativním onemocněním. *Cesk Slov Neurol N* 2019; 82: 115 Supplementum 2