

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

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

Mgr. Libuše Nosková

2022

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1.LF UK a VFN

Školitel: MUDr. Lenka Fialová, CSc.

Konzultant (byl-li): Prof. MUDr. Aleš Bartoš, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
1. Úvod	6
2. Cíle práce a hypotézy	8
3. Materiál a metody	9
4. Výsledky	12
5. Diskuse	20
6. Závěr	22
7. Použitá literatura	22
Seznam publikací autora	28

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 α -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 α -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

1. Úvod

Neurofilamenta (Nf) 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 u neurologických onemocnění

Neurofilamenta patří mezi IV. typ intermediálních filament. Tvoří heteropolymery ze 4 podjednotek – NfL (lehký řetězec o Mr 68kDa), NfM (střední řetězec o Mr 150-160 kDa), NfH (těžký řetězec o Mr 200 kDa) a α -internexin (v CNS) / peripherin (Beaulieu, Robertson *et al.* 1999, Yuan, Rao *et al.* 2006, Yuan, Sasaki *et al.* 2012). Podílejí se na vnitřní organizaci a kompartmentaci struktury neuronu a svojí síťovou strukturou poskytují ochranu proti opakovanému mechanickému pnutí během pohybu. Neurofilamenta jsou klíčová pro radiální růst, udržování vnitřního průměru axonu a myelinizaci (Zhu, Couillard-Despres *et al.* 1997, Elder, Friedrich *et al.* 1998a, Elder, Friedrich *et al.* 1998b).

První práce popisující zvýšenou hladinu neurofilament v biologických tekutinách byly publikovány v 90. letech 20. století (Rosengren, Karlsson *et al.* 1996). Zpočátku se výzkum soustředil zejména na analýzu mozkomíšního moku, stanovení neurofilament v séru nebo plasmě se významně rozvíjí zejména v poslední době, díky rozvoji vysoce citlivých metod (Kuhle, Barro *et al.* 2016). K uvolnění neurofilament z axonů dochází fyziologicky v konstantním množství, nicméně v případě patologického procesu, při němž se narušuje struktura neuronů, se hladiny neurocytoskeletálních proteinů zvyšují významně. Neurofilamenta jsou považována za citlivý marker axonálního poškození.

Zvýšené hladiny NfH byly prokázány u pacientů s roztroušenou sklerózou (RS), kde je i dobrá korelace s nálezy ze zobrazovacích metod (Teunissen, Jacobaeus *et al.* 2009, Kuhle, Leppert *et al.* 2011, Gnanapavan, Grant *et al.* 2013). Podobně se uplatňuje stanovení NfH i u demencí, zejména při rozlišení Alzheimerovy choroby (AD) a frontotemporální demence (Sjogren, Rosengren *et al.* 2000, de Jong, Jansen *et al.* 2007, Pijnenburg, Verwey *et al.* 2015).

Hladina NfM se výrazně zvyšuje u traumatického poškození mozku a cévních mozkových příhod (*Martinez-Morillo, Childs et al. 2015*), ale nově byla zvýšená hladina prokázána i u pacientů s poruchami schizofrenního spektra (*Runge, Balla et al. 2022*).

Nejvíce studovanou podjednotkou jsou NfL, u kterých je zvýšení hladiny patrné u většiny neurologických onemocnění oproti zdravým kontrolám (*Bridel, van Wieringen et al. 2019*). Podobně jako NfH se může uplatnit při rozlišování jednotlivých typů demencí. V případě roztroušené sklerózy je popsána dobrá korelace s nálezem ze zobrazovacích metod (*Uher, Schaedelin et al. 2020, Srpova, Uher et al. 2021, Uher, Havrdova et al. 2021, Camara-Lemarroy, Metz et al. 2022*).

Stanovení neurofilament u neurologických onemocnění se tak postupně více rozšiřuje i do klinické praxe, například by mělo být brzy doplněno do systému klasifikace Alzheimerovy choroby, tzv. ATN klasifikace, kde N označuje neurodegeneraci/neuronální poškození (*Khalil, Teunissen et al. 2018, Zetterberg and Blennow 2021*).

1.2. Protilátky u neurologických onemocnění

Protilátky (imunoglobuliny = Ig) jsou schopné vysoce specificky vázat konkrétní molekuly – antigeny. Tato vazba je charakterizována afinitou, což je síla vazby s konkrétním epitopem antigenu, a také aviditou, která vyjadřuje souhrnnou vazbu mezi protilátkou a antigenem – tedy i jeho různými epitopy. Avidita jednotlivých protilátek se zvyšuje s každým setkáním s antigenem a její stanovení může pomoci s rozlišením patogenního potenciálu protilátky (*Monsalvo, Batalle et al. 2011*) nebo sledovat účinnost očkování (*Boxus, Lockman et al. 2014*).

Protilátky proti antigenům vlastního těla se nazývají autoprottilátky a mohou být produktem imunopatologických reakcí nebo tzv. přirozeně se vyskytující protilátky (NAbs – naturally occurring antibodies), které mají především homeostatickou funkci a podílí se například na clearance proteinů ze stárnoucích nebo poškozených buněk (*Lutz 2007, Lutz, Binder et al. 2009, Abbas, Lichtman et al. 2015*).

U neurologických onemocnění patří stanovení celkových protilátek mezi základní vyšetření mozkomíšního moku, kdy se prokazuje také intratekální syntéza protilátek. Hladiny protilátek proti neurofilamentům byly studovány především u amyotrofické laterální sklerózy (ALS) (*Fialova, Svarcova et al. 2010, Puentes, Lombardi et al. 2021*), Alzheimerovy choroby (*Bartos, Fialova et al. 2012*) i roztroušené sklerózy (*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 se imunokomplex. Stabilita takového imunokomplexu pak závisí na konkrétním páru antigen-protilátka. Fyziologicky představuje tvorba těchto imunokomplexů především eradikační funkci například infekčních agens nebo uvolněných intracelulárních proteinů. Může se jednat ale i o patologický děj – imunopatologická reakce 3. typu (*Abbas, Lichtman et al. 2015*).

V případě imunokomplexů neurofilament s odpovídajícími protilátkami existuje studie sledující vliv podání natalizumabu na hladinu protilátek proti NfL a jejich imunokomplexů (*Puentes, Benkert et al. 2021*) a také hladiny těchto parametrů u ALS (*Puentes, Lombardi et al. 2021*). U pacientů s Alzheimerovou chorobou byly popsány výrazně zvýšené hladiny protilátek proti β -amyloidu vázané v imunokomplexech (*Maftai, Thurm et al. 2012, Maftai, Thurm et al. 2013*).

2. Cíle práce a hypotézy

Tato práce se zaměřila především na studium 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

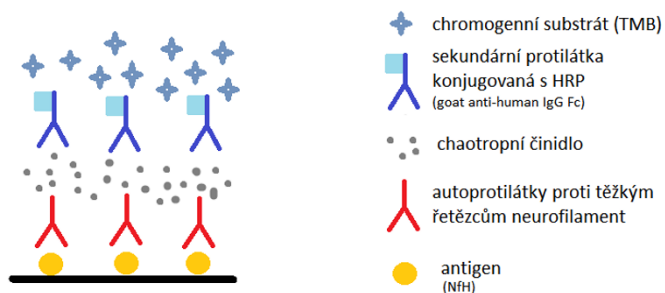
- 2) Cílem klinické části práce bylo stanovit protilátky proti NfH, jejich aviditu a jejich imunokomplexy s NfH u pacientů s Alzheimerovou chorobou.

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.

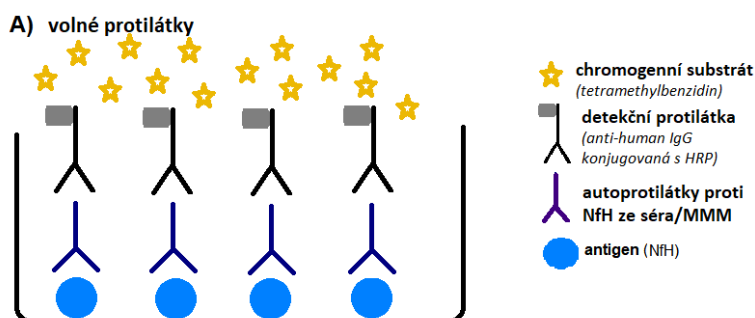
3. Materiál a metody

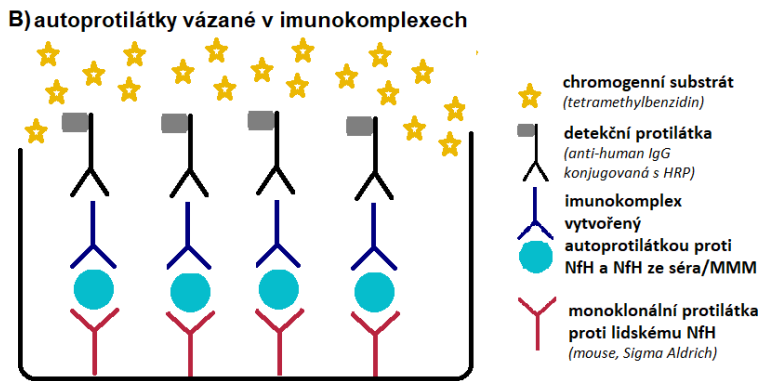
Hlavní metodou použitou v této práci je ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) v různých modifikacích, kdy jsme vycházeli z dříve publikovaných prací (Silber, Semra et al. 2002, Bartos, Fialova et al. 2007, Bartos, Fialova et al. 2012, Maftai, Thurm et al. 2012, Maftai, Thurm et al. 2013). Základní schéma metod je uvedeno v obrázku 1 a 2.



Obrázek 1 – schéma metody pro stanovení avidity anti-NfH IgG protilátek.

V případě stanovení avidity bylo potřeba vybrat vhodné chaotropní činidlo pro rozrušení vazeb mezi protilátkou a antigenem. Testována byla 2 činidla v různých koncentracích – NaCl o koncentracích 1 a 3 mol/l a urea o koncentracích 2 a 6 mol/l.





Obrázek 2 – schéma metody pro stanovení volných protilátek proti neurofilamentům (A) a jejich imunokomplexů (B).

V případě metod pro stanovení volných protilátek proti Nf a jejich imunokomplexů bylo nutné vybrat vhodné protilátky pro zachycení imunokomplexů a unifikovat postup se stanovením volných protilátek spolu s vhodnou kalibrací. Pro stanovení imunokomplexů anti-NfH IgG protilátek byla použita myší monoklonální protilátka od firmy Sigma Aldrich – anti-NEFH. Pro stanovení imunokomplexů anti-NfL IgG protilátek byly testovány dvě monoklonální protilátky – analogická myší monoklonální protilátka od firmy Sigma Aldrich anti-NEFL a myší monoklonální protilátka od firmy UmanDiagnostics – UD1. Jako sekundární protilátka – konjugát byla použita slepičí protilátka proti lidským IgG konjugovaná s peroxidasou (HRP-IgY, Sigma Aldrich). Jako antigen pro zachycení autoprotilátek byla využita hovězí neurofilamenta od firmy Progen.

Pro stanovení volných NfH v mozkomíšním moku byl použit kit MBS762268 od firmy MyBioSource a pro stanovení volných NfL kit od firmy UmanDiagnostics.

Výsledky byly měřeny na ELISA readeru Tecan Sunrise s programem Magellan v6, ve kterém byly také vytvářeny kalibrační křivky jednotlivých stanovení.

Koncentrace volných protilátek proti neurofilamentům a jejich imunokomplexů je vyjádřena v arbitrárních jednotkách, koncentrace volných neurofilament v pg/ml.

Výpočtové vztahy

Avidita se obvykle vyjadřuje ve formě aviditního indexu (AI) uváděného v procentech získaného podle vztahu:

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

Při porovnávání hladin protilátek v likvoru a séru se využívá jejich poměr, vyjádřený jako index Q získaný podle vztahu:

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

Statistika

Použity byly programy Statistica v12 a GraphPad v9. Normální rozdělení dat bylo ověřeno pomocí Shapiro-Wilkova testu. Vzhledem k nesplnění podmínky normality byly používány neparametrické metody – Spearmanův korelační koeficient, Wilcoxonův párový test, Mann-Whitney test a ANOVA (Kruskal-Wallis).

Soubory pacientů

Hlavní část práce se zaměřila především na pacienty s Alzheimerovou chorobou a vhodnou kontrolní skupinu párovanou podle věku. Charakteristika těchto skupin je uvedena v tabulce 1 a 2. Vzorky do této studie byly získány ve spolupráci s Neurologickou klinikou 3. LF UK a FNKV a Národním ústavem duševního zdraví.

Pro stanovení volných NfL s výhledem stanovení i protilátek a imunokomplexů bylo využito vzorků získaných ve spolupráci s Neurologickou klinikou 1.LF UK a VFN. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas a studie byly schváleny příslušnou etickou komisí.

Tabulka 1 – charakteristika skupin pro stanovení avidity anti-NfH IgG protilátek v séru.

	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

MMSE = Mini-Mental State Examination, základní vyšetření kognitivních funkcí

Tabulka 2 – charakteristika skupin pro stanovení volných anti-NfH IgG protilátek a jejich imunokomplexů v séru a likvoru.

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

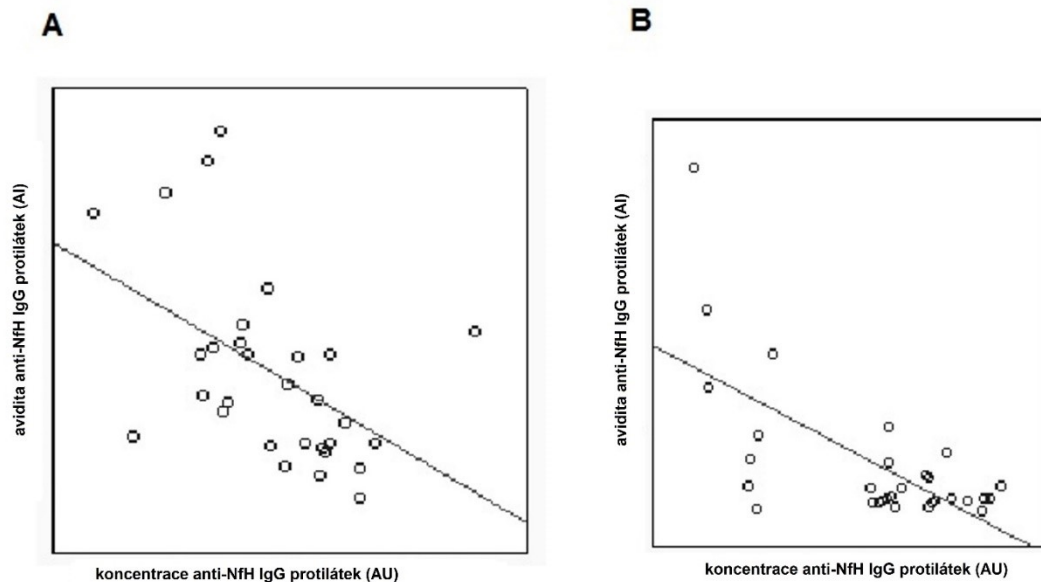
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr spolu se směrodatnou odchylkou.

4. Výsledky

4.1. Stanovení avidity anti-NfH IgG protilátek v séru pacientů s Alzheimerovou chorobou

Nejlepším chaotropním činidlem pro stanovení avidity anti-NfH IgG protilátek byla urea, která byla v koncentraci 6 mol/l schopna rozrušit dostatečné množství vazeb mezi antigenem a protilátkou.

Mezi hladinou protilátek a jejich aviditou byla nalezena negativní korelace, jak shrnuje obrázek 3. Při srovnání věkově párované kontrolní skupiny a skupiny pacientů s Alzheimerovou chorobou nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi hladinou a aviditou anti-NfH IgG protilátek, jak dokládá obrázek 4.

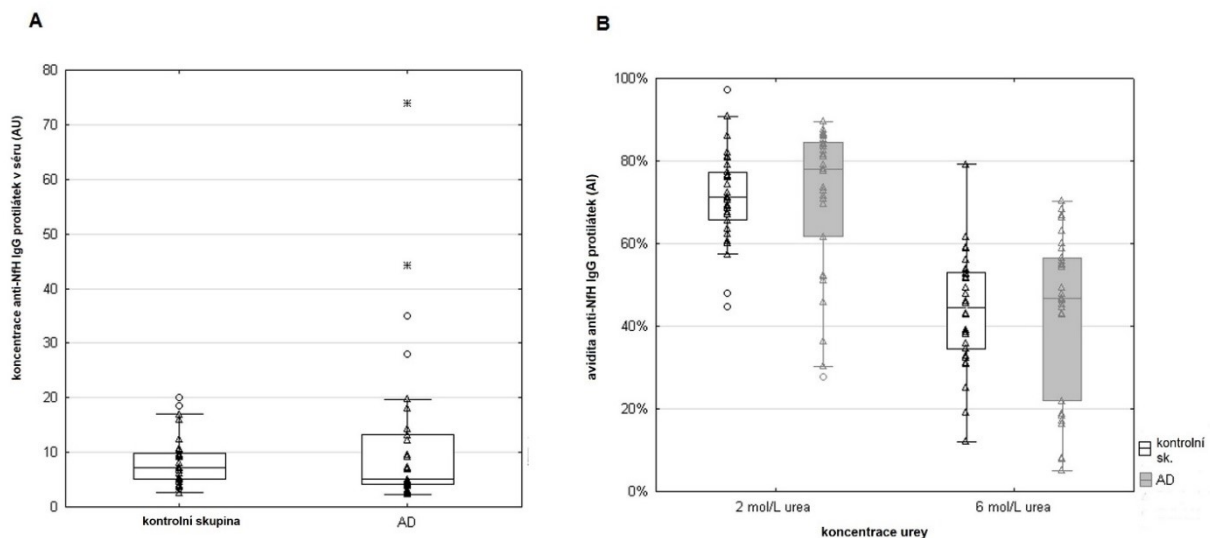


Obrázek 3 – korelace hladin anti-NfH IgG protilátek v séru a jejich avidity.

A) Kontrolní skupina, $R = -0,55$ (p^{**})

B) Skupina pacientů s Alzheimerovou chorobou, $R = -0,41$ (p^*)

AI – aviditní index; AU – arbitrární jednotky koncentrace; NfH – těžký řetězec neurofilament; R – Spearmanův korelační koeficient; p – hladina významnosti, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$



Obrázek 4 - 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.

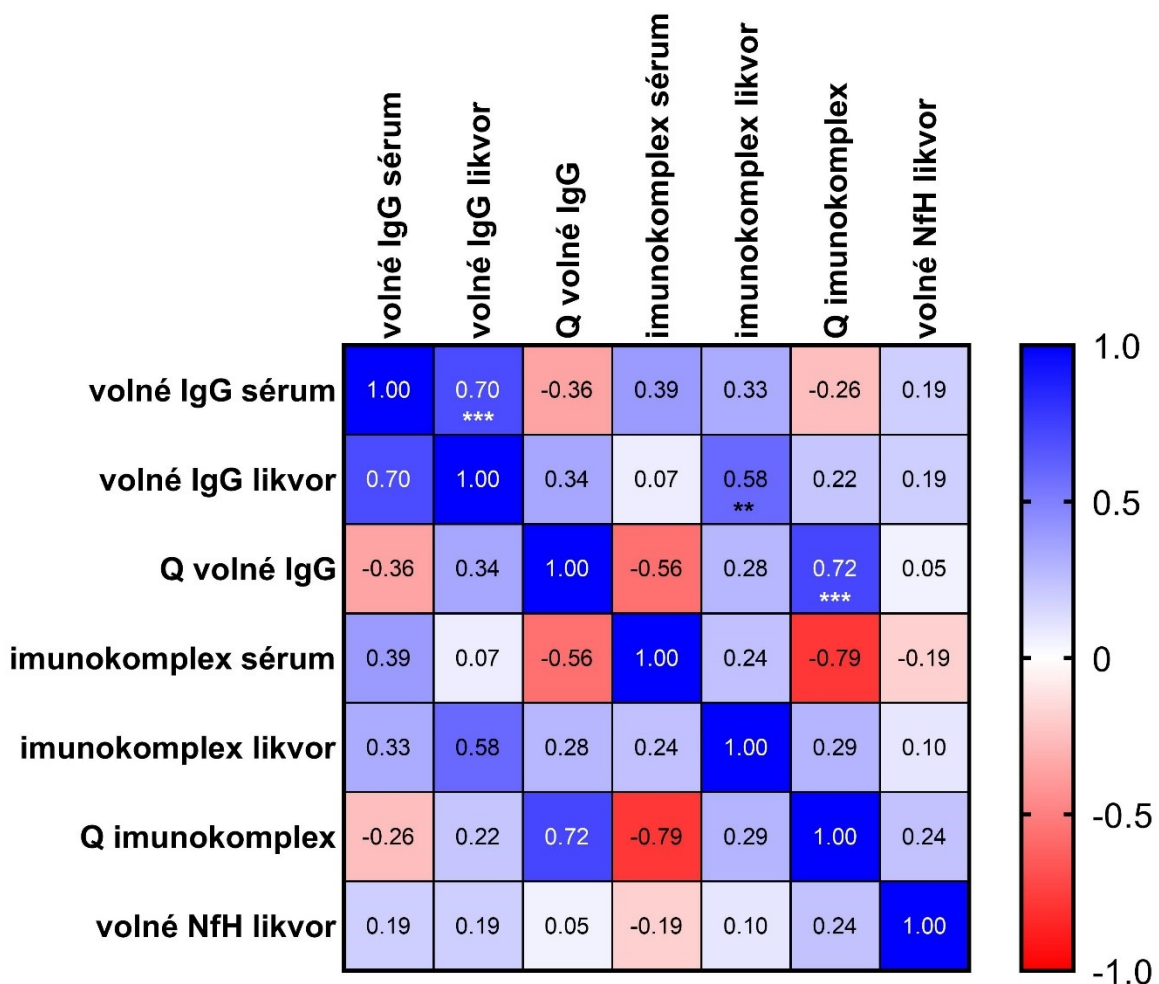
B) Avidita protilátek vyjádřená jako aviditní index v procentech. Signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a pacienty s Alzheimerovou chorobou nebyl nalezen.

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

4.2. Stanovení volných anti-NfH IgG protilátek a jejich imunokomplexů u pacientů s Alzheimerovou chorobou

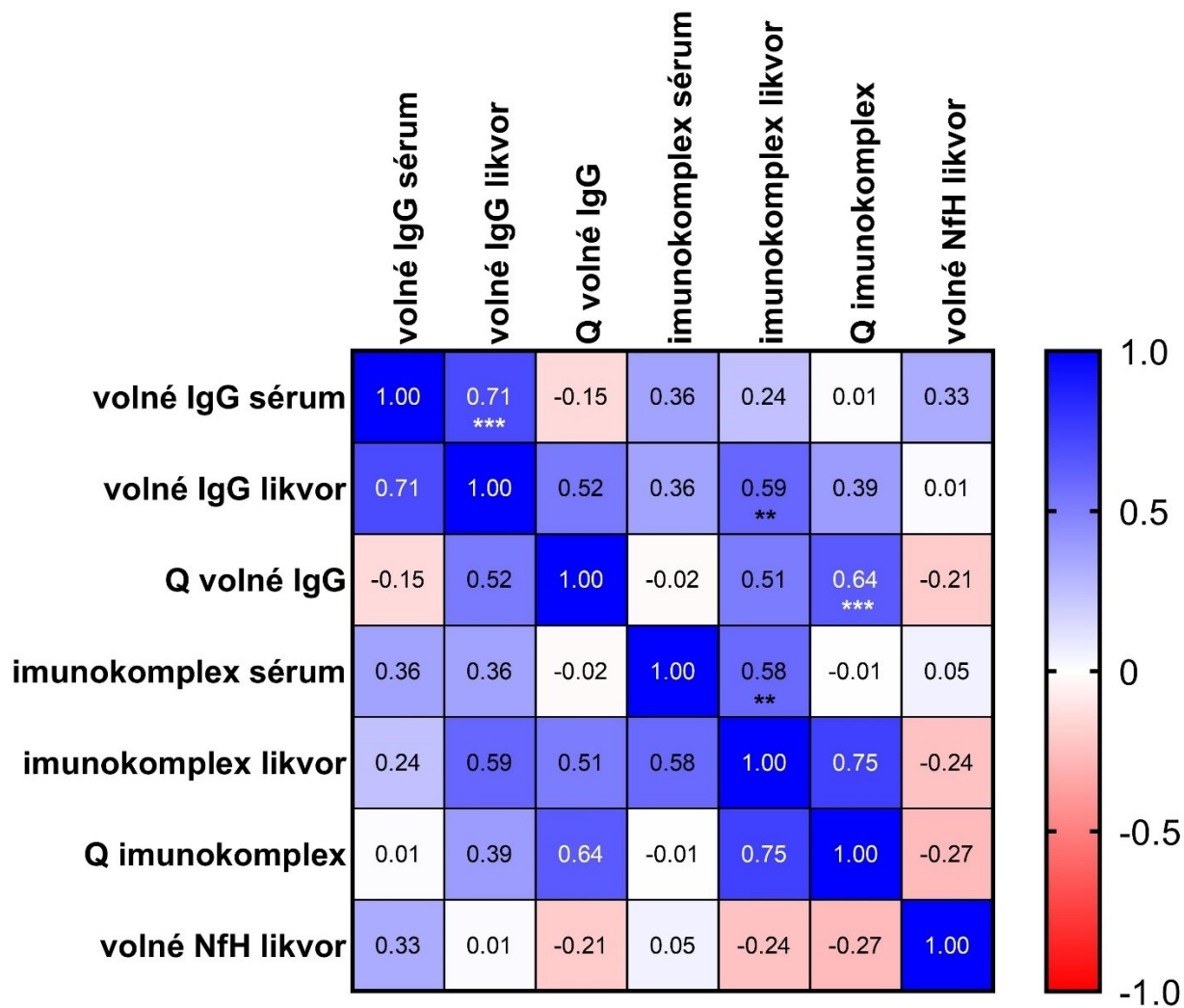
Soubor pacientů s AD byl doplněn o skupinu pacientů s mírnou kognitivní poruchou (MCI) a věkově spárovanou kontrolní skupinu (K) jejichž charakteristika je uvedena v kapitole metod.

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. Pokud srovnáme jednotlivé skupiny, pak nejvyšší korelace je ve skupině pacientů s Alzheimerovou chorobou. Nižší míra korelace hladin protilátek a imunokomplexů v kontrolní skupině a skupině pacientů s MCI může být dána vyšší heterogenitou souboru. Korelace s volnými NfH nebyla nalezena ani u jedné skupiny. Korelační matice pro jednotlivé soubory jsou shrnuty v obrázcích 5, 6 a 7.



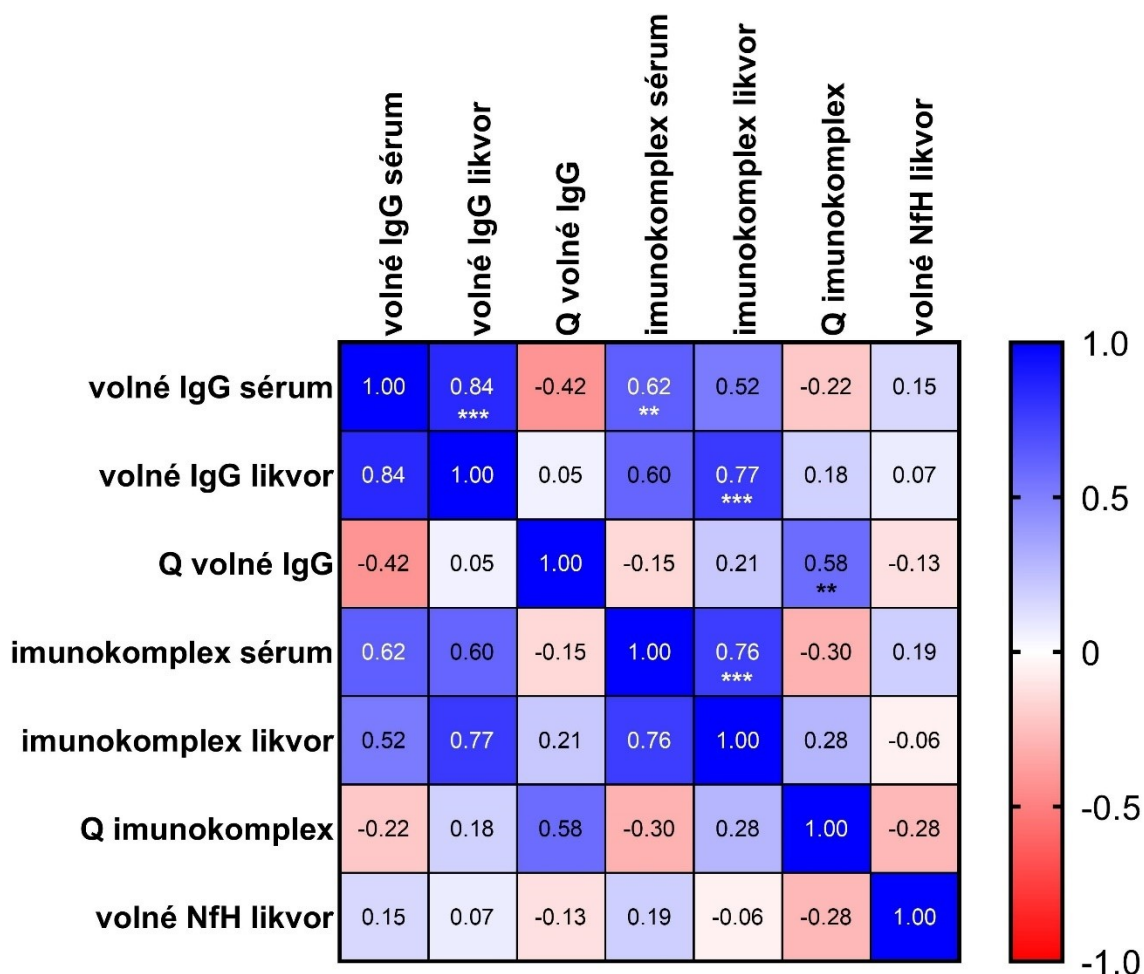
Obrázek 5 - Korelace jednotlivých parametrů v rámci kontrolní skupiny.

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 6 - Korelace jednotlivých parametrů v rámci skupiny pacientů s mírným kognitivním deficitem.

Významná je korelace volných protilátek i imunokomplexů mezi sérum a likvorem, protilátek a imunokomplexů v likvoru a také imunoglobulinových indexů Q. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$



Obrázek 7 - 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 AD je mezi volnými protilátkami a protilátkami vázaných v imunokomplexech s NfH úzký vztah. V likvoru je vztah volných protilátek a příslušných imunokomplexů významnější než v séru.

Pokud srovnáme experimentální skupiny mezi sebou, pak je jednoznačné snížení hladiny volných anti-NfH IgG protilátek i jejich imunokomplexů s NfH u pacientů s mírnou kognitivní poruchou zejména oproti kontrolní skupině. Statisticky signifikantní je tento rozdíl zejména u volných protilátek v likvoru. Při srovnání souboru pacientů s MCI a AD je rozdíl menší. Hladiny jednotlivých parametrů jsou shrnuty v tabulce 3 a obrázku 8.

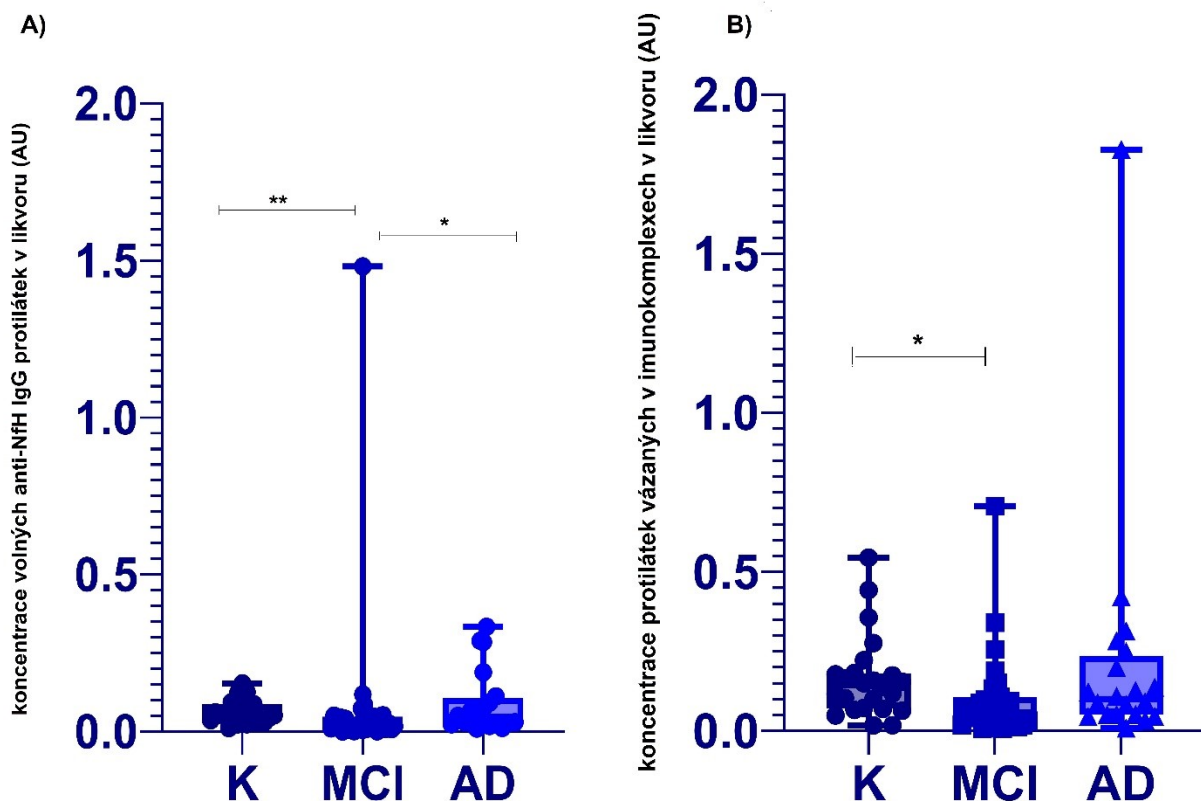
Tabulka 3 – A) Hladiny volných anti-NfH IgG protilátek a protilátek vázaných v imunokomplexech s NfH v rámci jednotlivých skupin pacientů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián a interkvartilové rozpětí.

	Biologický materiál	Kontroly	MCI	AD
počet vzorků		24	27	20
volné anti-NfH IgG protilátky	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)
anti-NfH IgG - NfH imunokomplexy	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)

B) hladiny volných NfH v rámci jednotlivých skupin

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

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



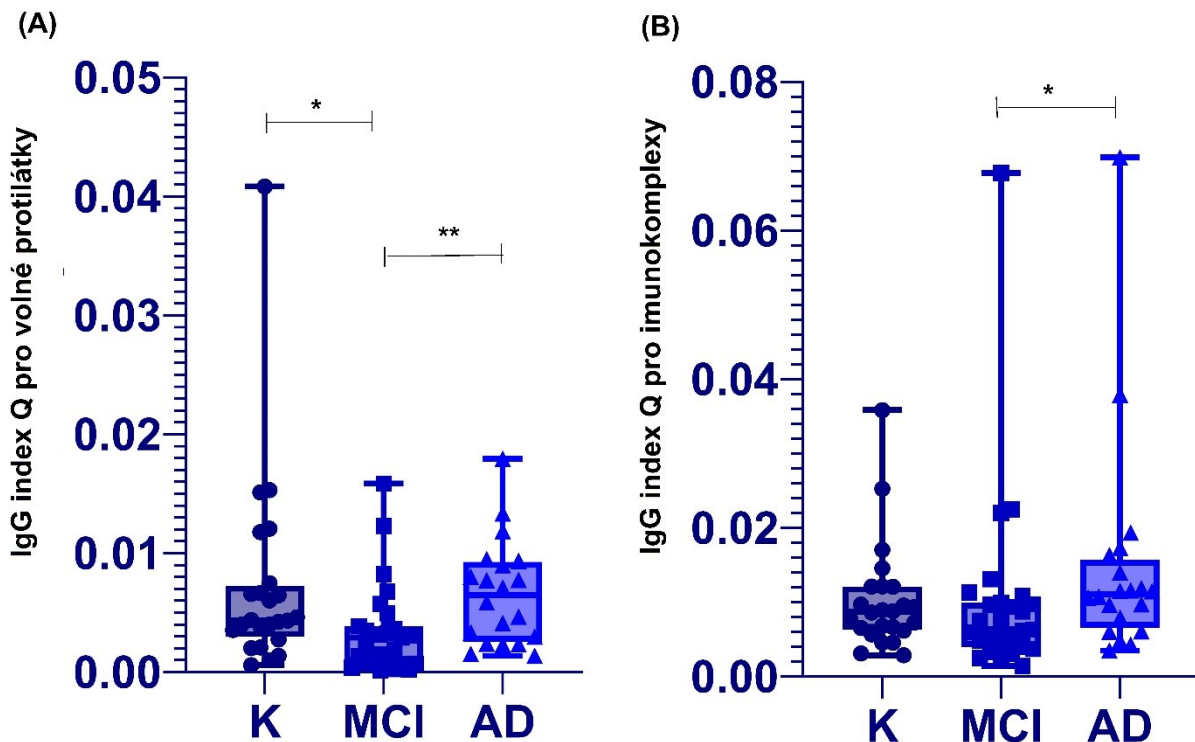
Obrázek 8 – Srovnání hladin volných protilátek a imunokomplexů mezi skupinami v likvoru.

A) Hladiny volných protilátek. **B)** Hladiny imunokomplexů.

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

Horizontální linie označuje medián a krabice pak interkvartilové rozpětí.

Pokud použijeme srovnání hladin volných protilátek a jejich imunokomplexů v séru a likvoru a vyjádříme jejich vztah ve formě indexu Q, pak opět vidíme signifikantní snížení u skupiny s MCI, při detailním pohledu však vidíme výraznější vzestup indexu u pacientů s AD a to pro volné anti-NfH IgG protilátky i jejich imunokomplexy – obrázek 9.



Obrázek 9 - 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.

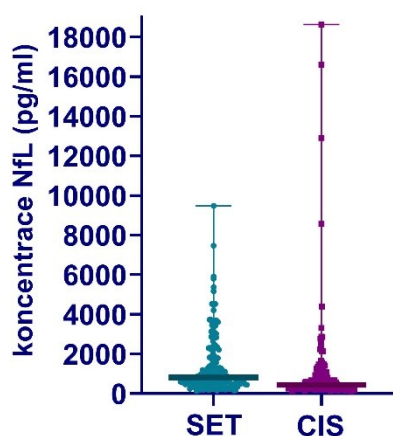
Q = hladina v mozkomíšním moku / hladina v séru. Horizontální linie označuje medián a krabice pak interkvartilové rozpětí.

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

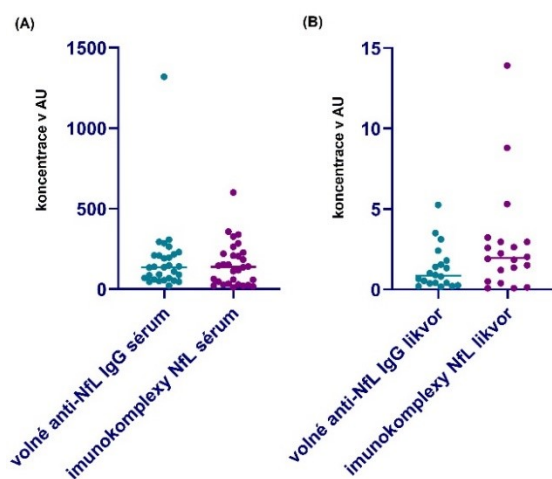
Získané výsledky naznačují, že autoprottilátky proti NfH v případě Alzheimerovy choroby mohou patřit jak mezi NAbs, tak patologické protilátky v závislosti na průběhu onemocnění. V kontrolní skupině budou zřejmě převládajícím typem protilátek NAbs podílející se na clearance konstantně uvolňovaných proteinů a tato schopnost bude zřejmě potencována v první fázi onemocnění – u pacientů s MCI. V pozdější fázi onemocnění – u pacientů s Alzheimerovou chorobou se pak začnou uplatňovat patologické autoprottilátky, jak lze pozorovat ze zvýšení jejich hladin.

4.3. Stanovení NfL, protilátek proti nim a jejich imunokomplexů

Stanovení volných lehkých řetězců neurofilament (NfL) je v současné době již velmi rozšířeným vyšetřením a připravuje se zavedení do klinické praxe. V mozkomíšním moku se hladiny NfL stanovují pomocí soupravy firmy UmanDiagnostics, která má CE-IVD certifikaci. V této práci byly hladiny NfL stanoveny u 2 souborů pacientů s CIS, RS a tato data jsou podkladem dalších studií, kdy část byla již publikována (*Friedova, Motyl et al. 2020, McComb, Krikheli et al. 2020*). Data jsou shrnuta v obrázku 10. Optimalizace metody pro stanovení volných anti-NfL protilátek a jejich imunokomplexů se tak zaměřila na využití protilátky od firmy UmanDiagnostics, která je právě i v uvedené soupravě pro stanovení volných NfL. Výsledky z pilotního testovacího souboru pacientů s různými diagnosami ukazují, že jsou protilátky i imunokomplexy dobře detekovatelné v séru i mozkomíšním moku a mohou tak doplnit stanovení volných NfL – obrázek 11. Analýza uvedených parametrů v klinických souborech je pak předmětem další práce.



Obrázek 10 - Hladina volných lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku u pacientů s klinicky izolovaným syndromem a RRMS (soubor SET). Horizontální linie označuje medián.



Obrázek 11 - Hladiny protilátek proti NfL a jejich imunokomplexů v séru a likvoru.

5. Diskuse

Zjistili jsme, že avidita anti-NfH IgG protilátek se signifikantně neliší mezi věkově párovanou kontrolní skupinou a pacienty s Alzheimerovou chorobou a protilátky nelze podle této analýzy zařadit jednoznačně mezi nízko- nebo vysokoaviditní protilátky.

Při studiu hladin volných anti-NfH IgG protilátek a jejich imunokomplexů s NfH jsme prokázali významné snížení obou sledovaných parametrů u skupiny pacientů s mírnou kognitivní poruchou, a to jak v séru, tak v mozkomíšním moku oproti kontrolní skupině a v případě mozkomíšního moku pak i oproti pacientům s AD. V mozkomíšním moku jsme prokázali významnou korelaci hladin volných protilátek s imunokomplexy, existuje mezi nimi tedy úzký vztah. Jsou-li hladiny volných anti-NfH IgG protilátek vyjádřeny ve formě indexu Q, který odráží vztah mezi sérem a likvorem, pak je významný rozdíl pozorován mezi kontrolní skupinou i oběma skupinami pacientů. Pokud se na tento index podíváme u protilátek vázaných v imunokomplexech, pak je významný rozdíl mezi pacienty s MCI a AD, kdy u pacientů s AD je tento index nejvyšší.

Stanovení volných NfL v mozkomíšním moku se postupně prosazuje do klinické praxe u vybraných neurologických onemocnění, kdy hladina NfL odráží axonální poškození. Námi získané výsledky u pacientů s RS/CIS tvoří podklad pro další analýzy relevantní u těchto onemocnění a jejich korelaci. Díky optimalizaci je metoda pro stanovení volných anti-NfL protilátek a jejich imunokomplexů připravena a stanovení protilátkových parametrů je tak vhodným doplněním analýzy volných NfL.

Vazba mezi protilátkou a příslušným antigenem je nekovalentní a interakce v takto vytvořeném imunokomplexu jsou pro něj charakteristické a je tak nutné je tak nutné upravit podmínky pro stanovení avidity pro konkrétní protilátky. Pro efektivní hodnocení avidity je podmínkou, aby chaotropní činidlo rozrušilo přibližně 50 % vazeb protilátky a antigenu (*Pullen, Fitzgerald et al. 1986*) a toto pro anti-NfH IgG protilátky splnila urea o koncentraci 6 mol/l. 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*), kdy jednoznačně vysokoaviditní protilátky mají aviditní index vyšší než 60%. U pacientů s AD byly popsány protilátky proti β -amyloidu s nižší aviditou (*Jianping, Zhibing et al. 2006, Cao, Lv et al. 2010*) a vzhledem k průkazu těchto protilátek i v přípravcích IVIG, předpokládá se, že se jedná spíše o NAbs, které se podílejí na clearance β -amyloidu (*Dodel, Du et al. 2004, Kile, Au et al. 2017*). Vyšší hladiny protilátek proti β -amyloidu vázaných v imunokomplexech popsali Maftai a kol. (*Maftai, Thurm et al. 2012, Maftai, Thurm et al. 2013*).

Autoprotilátky jsou obecně u Alzheimerovy choroby poměrně hodně studované (*Colasanti, Barbati et al. 2010, Bartos, Fialova et al. 2012, Beasley and Greer 2015*), nicméně závěry ze studií nejsou zcela jednoznačné. Na jedné straně existuje řada studií, které popsaly pozitivní efekt podávání přípravků IVIG, obsahující zejména NAbs, které se podílejí na 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*) a na druhé straně pak i v řadě studií popsali zvýšenou hladinu protilátek ve vztahu k onemocnění a progresi AD (*Bartos, Fialova et al. 2012, Maftai, Thurm et al. 2012, Maftai, Thurm et al. 2013*). Naše studie, která prokázala snížení anti-NfH IgG protilátek i imunokomplexů u pacientů s MCI naznačuje, že protilátky v kontrolní skupině budou patřit spíše do skupiny NAbs a později s progresí onemocnění do AD se může objevit tvorba patologických autoprotilátek a hladiny se začnou zvyšovat, což je v souladu například se studií (*Kile, Au et al. 2017*), kde byl pozitivní vliv podávání IVIG pozorován v prvním roce, ale v pozdější fázi už tento pozitivní efekt nebyl. 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 čistě proti neurofilamentům, pak byla popsána zvýšená hladina a intratekální syntéza protilátek u pacientů, kteří konvertovali z CIS do RS (*Fialova, Bartos et al. 2013*). Zvýšená množství protilátek byla nalezena i v MS lézích (*Sadaba, Tzartos et al. 2012*).

Ukazuje se tedy, že pro pochopení funkce autoprotilátek proti neurofilamentům je zapotřebí zejména studií s longitudinálním sledováním hladin protilátek/imunokomplexů a že sledování protilátkové odpovědi by se mohlo uplatnit při sledování progresu onemocnění.

6. Závěr

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. Použitá literatura

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

Bartos, A., L. Fialova, J. Soukupova, J. Kukal, I. Malbohan and J. Pitha (2007). "Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients." Acta Neurol Scand **116**(2): 100-107.

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.

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.

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.

Camara-Lemarroy, C., L. Metz, J. Kuhle, D. Leppert, E. Willemse, 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-Abeta antibodies in patients with cerebral amyloid angiopathy-related cerebral hemorrhage." Int J Neurosci **120**(12): 760-764.

Colasanti, T., C. Barbati, 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.

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.

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.

Elder, G. A., V. L. Friedrich, Jr., P. Bosco, C. Kang, A. Gourov, P. H. Tu, V. M. Lee and R. A. Lazzarini (1998a). "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 (1998b). "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.

Fialova, L., J. Svarcova, A. Bartos, P. Ridzon, I. Malbohan, O. Keller and R. Rusina (2010). "Cerebrospinal fluid and serum antibodies against neurofilaments in patients with amyotrophic lateral sclerosis." Eur J Neurol **17**(4): 562-566.

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.

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.

Hromadkova, L., M. Kolarova, B. Jankovicova, A. Bartos, J. Riczny, 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.

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.

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.

- 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.
- 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.
- Maftai, 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.
- Maftai, 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-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. Zivadnov, 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.
- 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.

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.

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.

Runge, K., A. Balla, B. L. Fiebich, S. J. Maier, B. Pankratz, A. Schlump, K. Nickel, R. Dersch, K. Domschke, L. Tebartz van Elst and D. Endres (2022). "Antibody indices of infectious pathogens from serum and cerebrospinal fluid in patients with schizophrenia spectrum disorders." Fluids Barriers CNS **19**(1): 61.

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. Hrnčiarová, C. Barro, M. Andelová, Z. Michalák, M. Vanecková, J. Krasenský, L. Nosková, E. K. Havrdová, J. Kuhle and D. Horáková (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.

Teunissen, C. E., E. Jacobaeus, 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.

Uher, T., E. K. Havrdová, P. Benkert, N. Bergsland, J. Krasenský, B. Srpova, M. Dwyer, M. Tyblová, S. Meier, M. Vanecková, D. Horáková, 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. Tyblová, K. Vodehnalová, P. Benkert, J. Oechtering, D. Leppert, Y. Naegelin, J. Krasenský, M. Vanecková, E. Kubala Havrdová, L. Kappos, R. Zivadinov, D. Horáková, 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.

Woznicová, 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., 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.

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.

Seznam publikací autora

1. publikace *in extenso*, 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**
- L. Fialová; L. Nosková; M. Kalousová; T. Zima; T. Uher; A. Bartoš. 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 *in extenso* bez vztahu k tématu disertace:

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. Řičný, L. Nosková, L. Fialová: Možnosti stanovení likvorového tripletu tau proteinů a β -amyloidu 42 metodami ELISA a orientační normativní vodítka. *Cesk Slov Ne urol N* 2019; 82/ 115(5): 533– 540

IF = 0,411