proLékaře.cz | 20.5.2024

HLAVNÍ A PARALELNÍ SEKCE

1.1. Demyelinizační onemocnění a likvorologie I

Serozní záněty v likvoru

O. Sobek[1], J. Mareš[2], L. Ceprová[3]
[1] *Laboratoř pro likvorologii, neuroimunologii, patologii a speciální diagnostiku, Topelex s.r.o., Praha*
[2] *Neurologická klinika LF UP a FN Olomouc*
[3] *Neurologické oddělení, ÚVN – VFN, Praha*

Laboratorní vyšetření mozkomíšního moku – likvoru má stále nezastupitelnou roli v neurologické diagnostice. Zánětlivé postižení CNS představuje jedno z hlavních témat likvorologické diferenciální diagnostiky. Rozsáhlou kapitolou jsou serózní záněty, pod jejichž obrazem se skrývá široké spektrum nozologických jednotek od autoimunitních demyelinizací, přes virové neuroinfekce po některé typy bakteriálních zánětů. Je podán přehled stěžejních laboratorních vyšetřovacích metod, kterou jsou dostupné v rámci likvorologické diagnostiky, vč. jejich významu v rámci diferenciální diagnostiky. Klinické využití laboratorních parametrů je názorně je demonstrováno na vybraných kazuistikách.
Klíčová slova: záněty CNS – likvor – demyelinizační onemocnění – neuroborelioza – cytologie – průtoková cytometrie – izoelektrická fokuzace – cytokiny

Neurofilamenta jako biomarkery aktivity a progrese RS

P. Štourač[1], M. Petrášová[1], D. Zeman[2], M. Beňovská[2]
[1] *Neurologická klinika LF MU a FN Brno*
[2] *ÚLM-OKB LF MU a FN Brno*

Úvod: Neurofilamenta a jejich jednotlivé podjednotky se do tělesných tekutin uvolňují při poškození neuronů. Jako biomarker jsou neurofilamenta sledována nejen u RS, ale i neurodegenerativních onemocnění a poranění mozku. V naší studii sledujeme hladinu fosforylovaného těžkého řetězce neurofilament (pNFH) u pacientů s RS na vysoce účinné léčbě s cílem stanovit, zda by pNFH mohl jako biomarker poskytnout informace o klinickém průběhu a účinnosti léčby u této skupiny pacientů.
Metody: Hladiny pNFH jsme měřili prospektivně pomocí metody ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) v séru 47 pacientů s RS užívajících léčbu s vysokou účinností – natalizumab (n = 39) a okrelizumab (n = 10), a to v úvodním odběru (V0), následně po přibližně 6 měsících (V1), po 1 roce (V2) a po 2 letech od úvodního odběru (V3).
Výsledky: Hodnoty pNFH korelovaly významně v průběhu sledování (V0 s V1, V2 i V3) u jednotlivých účastníků. Hladiny pNFH se v odběrech (V0–V3) u pacientů na odlišné léčbě nelišily. Délka užívaní vysoce účinné léčby před prvním odběrem, ataka v mezidobí, změna na MR ani index John Cunningham viru neměly v naší kohortě na hodnotu pNFH vliv. Také u dalších klinických parametrů – doba od diagnózy v letech, EDSS a MSSS se vliv neprokázal.
Závěr: Naše data naznačují, že hladina pNFH může být intra-individuálně v čase relativně konzistentní. Korelace mezi hladinou pNFH a faktory radiologickými a klinickými nebyla ve sledované populaci prokázána, nicméně v delším časovém úseku a na větším souboru nelze tuto korelaci vyloučit.

Úloha rezidentných buniek mozgu pri udržiavaní poškodzujúceho zápalu pri sclerosis multiplex – naše výsledky

E. Kantorová[1], P. Hnilicová[2], M. Grendár[2], K. Zeleňák[3], J. Grossmann[1], Š. Sivák[1], E. Hečková[4], A. Lipka[4], E. Kurča[1], W. Bogner[4]
[1] *Neurologická klinika JLFUK v Martine, SR*
[2] *Biomedicínske centrum JLFUK v Martine, SR*
[3] *Rádiologická klinika JLFUK v Martine, SR*
[4] *High Field MR Centre, University of Vienna, Austria*

Úvod: Sclerosis multiplex (SM) je tradične považované za autoimunitné demyelinizačné ochorenie CNS, iniciované aktiváciou imunitného systému na periférii a prestupom aktivovaných T- a B-lymfocytov cez otvorenú hematoencefalickú bariéru.
Cieľ: Náš tím sa zameral na sledovanie molekulárnych zmien mozgu vo vzťahu k ostatným známym klinickým a laboratórnym markerom SM, s cieľom odhaliť mechanizmy pretrvávania aktivity a tichej progresie ochorenia.
Metodika: Probandov sme testovali pomocou magnetickej rezonančnej spektroskopie (1HMRS), ktorá odhaľuje molekulárnu úroveň a hodnotí metabolity CNS. Vyšetrenia sme robili na štandardných MR prístrojoch 1,5 a 3,0T, tiež v nadštandardnej GABA-editovanej 1H-MRS, a v MR s vysokým rozlíšením 7T. V úvode sme pozornosť sme zamerali na podkôrovú sivú hmotu, zmapovali málo preskúmaný hypothalamus. Neskôr sme testovania rozšírili na viaceré jadrá podkôrovej sivej hmoty. Zároveň sme realizovali i mapovanie mozgu ako celku, a porovnali sme nálezy s dostupnými klinickými a laboratórnymi biomarkermi.
Výsledky: V hypothalame sme zistili zvýšený pomer neurotransmitera glutamátu (Glu) voči N-acetylaspartátu, ktorý koreloval so závažnejším priebehom ochorenia, depresiou a únavou našich pacientov, a bol detekovaný už v ranných štádiach ochorenia. Deregulácia excitačných-inhibičných mediátorov (GABA, Glu) v thalame, zníženie inhibičnej GABA, a astrocytárna aktivácia meraná nárastom myoinozitolu, súvisela s horším kognitívnych výkonom SM pacientov [1,2], a bola výraznejšie vyjadrená u pacientov s pozitívnou oligoklonálnou skladbou protilátok v likvore [3]. Vyšetrenia v 7T prístroji priniesli dôkaz o difúznej poruche bielej hmoty mozgu pri SM. Rozsiahle zmeny, signalizujúce aktiváciu mikroglie/astrocytov, boli zaznamenané u pacientov, ktorí boli klinicky stabilní, a v oblastiach, kde neboli prítomné demyelinizačné ložiská na konvenčnom MR prístroji [4]. V pokračujúcom sledovaní bola meraná metabolická aktivita v okolí T1 hypointenzných ložísk. Boli identifikované „hotspoty", charakterizované vysokou koncentráciou aktivovanej glie/astrocytov, a to nielen v okolí ložísk, ale aj na iných miestach mozgu, kde sa zjavné T1 ložiská nenachádzali, napr. subkortikálne [5].
Záver: Mikroglia a astrocyty slúžia v mozgu na uržanie rovnováhy medzi excitačnými a inhibičnými neurotransmitermi, sú miestom premeny Glu na GABA a naopak. V našich štúdiách bola zvýšená aktivita astrocytov, v súlade so zmenami Glu a GABA, dominujúcom príznakom. Spoločne s rozsiahlymi subklinickými zmenami mozgu výsledky naznačujú

proLékaře.cz | 20.5.2024

dlhodobú dekompenzáciu vrodených imunitných mechanizmov. Naše nálezy nepriamo podporujú teóriu o možnej chronickej aktivácii mozgových buniek, ktorá je zodpovedná za vznik a udržiavanie zápalových zmien CNS.

Literatúra:
1. Kantorová E et al. Neurol Res 2017; 39(4): 323–330.
2. Kantorová E et al. Neurol Res 2021 44(2): 1–8.
3. Kantorova et al. Mult Scler Relat Disord 2021; 52.
4. Heckova E. Radiology 2022; 303(1): 141–115.
5. Lipka A. et al Invest Radiol 2023; 58(2): 156–165.

Dynamika biomarkerů při monitoraci efektivity léčby RS

P. Kušnierová
Ústav laboratorní medicíny, Oddělení klinické biochemie, LF OU a FN Ostrava

Roztroušená skleróza (RS) je demyelinizační onemocnění centrálního nervového systému a její terapie se za posledních 20 let pozoruhodně rozšířila. Aktualizovaná McDonaldova diagnostická kritéria (Thompson AJ et al. 2017) umožňují dřívější diagnózu také díky diagnostickému použití oligoklonálních pásů v mozkomíšním moku (CSF). Magnetická rezonance zůstává nejčastěji používaným diagnostickým a monitorovacím nástrojem, ale její nálezy vždy nekorelují s klinickým postižením. V důsledku toho existuje potřeba nalezení nových sérových biomarkerů pro kvantifikaci a sledování stavu pacienta. Naše studie se zaměřila na pozorování dynamiky 2 perspektivních biomarkerů, fosforylovaných těžkých řetězců neurofilament (pNfH) a chitinase 3-like 1 (CHI3L1) s cílem získat podrobnější informace o jejich dynamice v čase a korelaci s klinickými a MR parametry signalizujícími úspěšnost/neúspěšnost léčby.

Likvorový obraz LMM – leptomeningeální metastáza

H. Žáková, L. Fišerová
Institut laboratorní medicíny Lab In

Leptomeningeální metastáza (LMM), dříve nazývaná Maligní infiltrace mening (MIM), vždy byla, a i nadále je, velkým až obrovským diagnostickým i terapeutickým problémem. Diagnostika byla v naprosté většině případů možná pouze pomocí likvorové cytologie, její hodnocení je však, vždy a i často, velmi subjektivní. Různí autoři udávají různý počet údajně spolehlivých schémat a kritérií na posouzení přítomnosti malignity, je to však ale velmi závislé na zkušenostech konkrétního klinického cytologa či i patologa. Značným posunem bylo zavedení imunocytologie, ta je však vždy limitována počtem elementů v likvoru, dále velmi omezenou možností detekovat více parametrů současně. Průtoková cytometrie je též přínosná, ale bezpečnou detekci či identifikaci umožňuje pouze v ojedinělých případech, což bylo dokumentováno i publikacemi. Při posuzování těchto nálezů nabízí se úvaha o možném či i praktickém využití likvorových proteinů k diagnostice LMM či alespoň jejich zpětného posouzení v aktuální databázi. Toto bylo provedeno pouze v těch případech LMM, kdy bylo možno doložit i vyhotovení kompletního likvorového proteinogramu, těchto ale je doložitelných pouze 318 z celé databáze. Ihned bylo nutno nálezy s přítomností malignity dále rozdělit na syndromy Tumorózní pleiocytózy a Tumorózní oligocytózy. Klasifikace maligních nálezů se poněkud vymyká obecným pravidlům dnes již klasické likvorové cytologie dle převahy buněčné populace a známek aktivace v jednotlivých buněčných řadách či přítomnosti fagocytózy, za bernou minci je považován pouze záchyt maligních buněk ve zcela obecné rovině. Bylo nutno ustanovit i kontrolní skupinu, též s doložitelně vyhotoveným kompletním likvorovým proteinogramem a normálního stavu hematolikvorové bariéry (HLB), ta byla založena na přítomnosti normálního biochemického i cytologického nálezu, její rozsah je překvapivě vysoký až obrovský, 4 216 pacientů. To, co bylo považováno za nutné vyhodnotit a statisticky věrohodně posoudit, byly v likvoru i sérech těchto pacientů tři již dlouhou dobu zajímavé, a ne vždy zcela výstižně hodnocené likvorové proteiny: C3c Complement, CRP a Orosomucoid (AAG). Extrahepatální syntéza reaktantů akutní fáze byla již v minulosti prokázána, z těchto tří proteinů právě u CRP, v CNS konkrétně i v motorické mozkové kůře, zóna IV a zčásti i III. Syntéza C3c a AAG zatím extrahepatálně potvrzena nebyla. V pokusu in vitro bylo prokázáno, že AAG inhibuje proliferaci, invazi a metastazování nádorových buněk. Zde však bylo nutno bezpečně a spolehlivě potvrdit či i přímo vyvrátit předchozí vlastní pozorování či i publikace na toto téma, které byly do této doby založeny pouze na malých souborech a bez vyhotovení kompletního likvorového proteinogramu. Dále byla vždy vyhodnocena energetika likvoru podle cytoenergetického principu podílem glykorhachie a laktátu či vice versa (Hanzal et al. 1955 a 1963, Hepnar et al. 2018). byl posouzen i likvorový iontogram, nyní již prakticky nepoužívaný, velmi bohužel, dále i aktivita LD (LDH), která do této doby nebyla v likvoru nikdy popsána věrohodně či na velkém souboru pacientů. Toto vše bylo možno učinit s podporou a s pomocí pěti grantových projektů, z nichž jeden byl vyhodnocen jako nejvyšší level A a získal i cenu Společnosti klinické biochemie za nejlepší zahraniční a anglicky psanou publikaci, IF 4,5. Jako vhodná statistická metoda byly zvolen dnes již klasický Mann-Whitney U test a test Kruskal-Wallisův, (KW-H test, tedy neparametrická a jednofaktorová ANOVA pro srovnávání více než dvou skupin). Výsledky této studie je jistě možno považovat za naprosto spolehlivé i za zcela prioritní. Ovšem, jak zmíněno pak níže, bude nutno uvážit další postup. Více předchozích úvah bylo potvrzeno, některé ale byly i vyvráceny, což je pouze a velice dobře. Velmi se mezi sebou liší nálezy u syndromu Tumorózní pleiocytózy a u Tumorózní oligocytózy. Jako statisticky vysoce významné se u malignity projevil vzestup C3c a AAG, právě u AAG bylo toto na malém souboru potvrzeno již v minulosti. Naopak však, samotná koncentrace CRP u malignit v likvoru je spíše pouze na hranici statistické významnosti, jeho role je jistě cenná jinde, u zánětů CNS zejména, hnisavých i serózních. Samotná funkce hematolikvorové bariéry, HLB, není zde tak podstatná jako samotná koncentrace v likvoru. Aktivita LD je u malignit prokazatelně v likvoru zvýšena, toto bude potřebovati dalšího následného posouzení. Je totiž zvýšena i u hnisavých meningitid, které zde nebyly brány v potaz vůbec. Podobně je tak tomu i u Hanzalovy cytoenergetiky. Ta je vždy podstatná u zánětů CNS, podklad u LMM není zcela zde jasný či dokonce jednoznačný, je třeba dále toto rozvinouti. V likvorovém iontogramu bylo lze pozorovat snížení chloridových aniontů, což ale bylo pozorováno,

proLékaře.cz | 20.5.2024

leč doposud nepublikováno, i u hnisavých meningitid. V minulosti toto bylo pozorováno u tuberkulózních meningitid, dříve dělených klasicky na pět podtypů. Toto dělení již zaniklo, je zde nutná úvaha, nakolik to bylo oprávněné. Podkladem je u nich nejspíše oxidativní burst, vzplanutí, kdy chloridové anionty přecházení v anionty chlornanové, tyto však již nelze ISE elektrodou detekovat. Podkladem u LMM může být i úloha doprovodného a vždy jistě i přítomného zánětlivého obrazu, což pozorují i dokumentují patologové ve tkáňových řezech jako doprovodnou reakci kulatobuněčného infiltrátu při přítomnosti malignity, ovšem převážně u barvení HE (hematoxylin-eosin), nepoužívaného u likvoru; podklad v likvoru však není doposud jasný. Otázkou je, zdali je toto vůbec podstatné či se jedná pouze o epifenomen. Bude nutno se nad tímto podrobně dále zamyslet i doplnit další pozorování. Je to tedy výzva pro současnost i do blízké budoucnosti.