

Lehké řetězce neurofilament v séru a mozkomíšním moku a stav hematolikorové bariéry u vybraných neurologických onemocnění

Neurofilament light chains in serum and cerebrospinal fluid and status of blood-CSF barrier in the selected neurological diseases

Souhrn

Cíl: Cílem studie bylo posoudit vztah mezi permeabilitou hematolikorové bariéry (HLB) hodnocené albuminovým kvocientem (Q_{alb}) a hladinami lehkých řetězců neurofilament (NFL) v séru a mozkomíšním moku u několika skupin pacientů s neurologickými onemocněními, u nichž je porušení HLB vyjádřeno s rozdílnou intenzitou. **Soubor a metodika:** Soubor o celkovém počtu 137 pacientů zahrnoval 50 nemocných s RS vč. klinicky izolovaného syndromu, 24 pacientů s Alzheimerovou nemocí, 17 pacientů s aseptickými neuroinfekcemi, 36 pacientů s různými nezánettivými neurologickými onemocněními a 10 symptomatických kontrol. Metodou ELISA byly stanoveny hladiny NFL v séru a mozkomíšním moku pacientů a imunonefelometricky hladiny albuminu, z nichž byl vypočítán Q_{alb} . **Výsledky:** U žádné ze sledovaných skupin nebyla prokázána pozitivní korelace mezi hladinami NFL v séru a hodnotou Q_{alb} . Hladiny NFL v likvoru pozitivně korelovaly s hodnotou Q_{alb} u pacientů s aseptickými neuroinfekcemi a pacientů s nezánettivými neurologickými onemocněními. Ve skupině pacientů s aseptickými neuroinfekcemi byla nalezena pozitivní korelace mezi hladinami NFL v séru a v likvoru, stejně tak při hodnocení souboru pacientů jako celku. **Závěry:** Zdá se, že sérové hladiny NFL nejsou přímo ovlivněny permeabilitou HLB posuzované Q_{alb} u neurodegenerativních onemocnění a neuroinfekcí. Naopak na vztah mezi likvorovými hladinami NFL a Q_{alb} může mít vliv charakter neuropatologických změn u jednotlivých neurologických onemocnění.

Abstract

Aim: The aim of this study was to assess the relationship between blood-CSF barrier permeability evaluated by the albumin quotient (Q_{alb}) and levels of neurofilament light chains (NFL) in serum and cerebrospinal fluid (CSF) in several groups of neurological patients with a different degree of the impairment of blood-CSF barrier. **Materials and methods:** The total number of 137 participants included 50 patients with multiple sclerosis with the inclusion of clinically isolated syndrome, 24 patients with Alzheimer's disease, 17 patients with aseptic neuroinfections, 36 patients with various non-inflammatory neurological diseases and 10 symptomatic controls. Serum and CSF NFL levels were determined by the ELISA method. Serum and CSF albumin levels were tested by immunonephelometry. Q_{alb} was calculated as a ratio of CSF/serum albumin levels. **Results:** No positive correlations between serum NFL levels and Q_{alb} values were found in the tested patients' groups. CSF NFL levels were positively correlated with Q_{alb} values in patients with neuroinfections and in patients with non-inflammatory neurological diseases. A positive correlation between serum NFL levels and those in CSF was found in patients with aseptic neuroinfections even when patients were evaluated as a whole. **Conclusions:** Serum NFL levels do not seem to be directly influenced by blood-CSF barrier permeability assessed by Q_{alb} in neurodegenerative diseases and neuroinfections. On the contrary, the relationship between CSF NFL levels and Q_{alb} may be affected by the characteristics of the neuropathological changes in individual neurological diseases.

Práce byla podpořena projekty: PROGRES Q25 a Q35; „Udržitelnost pro Národní ústav duševního zdraví“, č. LO1611; MŠMT v rámci Národního programu udržitelnosti I (NPU I); MZ ČR – RVO VFN 64165, VFN v Praze a MZ ČR – RVO „Národní ústav duševního zdraví – NUDZ, IČ: 00023752“.

Auři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

L. Fialová¹, A. Bartoš^{2,3}, J. Švarcová⁴

¹ Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky,

1. LF UK a VFN v Praze

² Národní ústav duševního zdraví, Klecany

³ Neurologická klinika 3. LF UK

a FN Královské Vinohrady, Praha

⁴ Ústav lékařské chemie a klinické biochemie, 2. LF UK a FN Motol, Praha



MUDr. Lenka Fialová, CSc.

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky

1. LF UK a VFN

Kateřinská 32

121 08 Praha 2

e-mail: lfial@lf1.cuni.cz

Přijato k recenzi: 12. 9. 2017

Přijato do tisku: 10. 1. 2018

Klíčová slova

albuminový kvocient – Alzheimerova nemoc – cytoskelet – hematolikorové bariéra – roztroušená skleróza – neuroinfekce – neurofilamenta

Key words

albumin quotient – Alzheimer's disease – cytoskeleton – blood-CSF barrier – multiple sclerosis – neuroinfection – neurofilaments

Úvod

Neurofilamenta reprezentují podstatnou součást neurocytoskeletálních struktur přítomných v tělech i ve výběžcích neuronů centrálního a periferního nervového systému. Heteropolymerní struktura neurofilament je tvořena třemi základními podjednotkami, kterými jsou lehké (NFL), střední (NFM) a těžké řetězce (NFH) označované jako neurofilamentový triplet. Nejhojnější součástí neurofilament představují NFL, která jsou přítomna v každém neurofilamentu společně s NFH nebo NFM a jsou soustředěna zejména do oblasti axonů [1].

Při poškození axonů se mohou jednotlivé řetězce neurofilament uvolňovat do extracelulárního prostoru. Hladiny řetězců neurofilament v biologických tekutinách jsou studovány jako biomarkery vypovídající o narušení axonálních struktur, které doprovází různá neurologická onemocnění. Řada studií ukázala, že hladiny jednotlivých neurofilamentových řetězců mohou mít klinický význam u RS, demencí, cévních mozkových příhod a dalších neurologických chorob [2–5].

Pozornost kliniků se soustřeďuje zejména na NFL a NFH. NFL mají z neurofilamentového tripletu nejmenší molekulovou hmotnost. To usnadňuje jejich časnější průnik do mozkomíšního moku (cerebrospinal fluid; CSF) ve srovnání s většími NFH [6]. První klinicky zaměřené studie se orientovaly na stanovení hladin jednotlivých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku [7]. Zavedení citlivějších imunoanalytických metod umožnilo sledovat hladiny neurofilamentových řetězců i v séru/plazmě, v nichž jsou koncentrace podstatně nižší [8–11].

V našich předchozích analýzách jsme hodnotili hladiny NFL v séru a mozkomíšním moku z hlediska jejich změn u pacientů s některými onemocněními doprovázenými poškozením axonů – RS a Alzheimerovou nemocí (AN) [5,12].

Roztroušená skleróza je chronické demyelinizační onemocnění, na němž se podílí autoimunitní zánět společně s neurodegenerativními procesy [4,13]. Poškození axonů se dostavuje již v časných fázích onemocnění a přispívá k progresi onemocnění [14]. Náhlý vznik prvních ložiskových neurologických příznaků, které mohou, ale nemusí progredovat do stavu definitivní RS, se označuje jako klinicky izolovaný syndrom (CIS) [15]. RS vč. CIS je jedním z onemocnění, u kterého se pozornost výzkumníků soustřeďuje na stanovení NFL v séru [5,8,16]. Z dřívějších studií, které analyzovaly hladiny NFL v mozko-

míšním moku, vyplývá, že tyto struktury neurocytoskeletu se jeví jako vhodné časné biomarkery poškození axonů [5,17]. Jejich zvýšení je pozorováno již ve fázi CIS, zejména u pacientů, kteří konvertují do klinicky definitivní RS [6]. Řada novějších prací, které se již orientují na stanovení NFL v séru, naznačuje, že i sérové hladiny NFL odrážejí narušení axonů v časně i rozvinuté fázi RS a že sérové hladiny reagují na účinnost terapie [8,16].

Alzheimerova nemoc je další závažná neurodegenerativní choroba. Hlavními neuropatologickými projevy AN je vznik extracelulárně uložených amyloidových senilních plaků tvořených β -amyloidem a intracelulárních neurofibrilárních klubek. Na jejich vzniku se nejen podílí hyperfosforylované τ -proteiny, ale předpokládá se i zapojení neurofilament [18,19]. V diagnóze AN se kromě hodnocení kognitivních funkcí mohou uplatnit i některé likvorové biomarkery, kterými je tzv. likvorový triplet zahrnující celkový a fosforylovaný τ -protein společně s β -amyloidem [20]. Kromě likvorového tripletu diferencuje pacienty s AN od kontrol i hladina NFL [21]. Zvýšení hladin NFL je prokazováno jak v likvoru, tak i v plazmě/séru [9]. Novější studie naznačují, že NFL v plazmě by mohla představovat neinvazivní biomarker neurodegenerace vč. AN [9,22].

Problém při stanovení proteinů mozkového původu v séru může představovat skutečnost, že jejich hladiny v krvi mohou být ovlivněny poškozením hematolikorové bariéry (HLB) nebo hematoencefalické bariéry (HEB), které doprovází některá neurologická onemocnění [23,24]. V nedávné práci bylo ukázáno, že sérové hladiny NFL nekorelují s hodnotami Q_{alb} [25].

Cílem naší studie bylo navázat na výsledky práce Kalma et al [25] a u pacientů z našich předchozích výzkumů posoudit vztah mezi permeabilitou HLB a hladinami NFL v séru a mozkomíšním moku. K pacientům s RS vč. CIS a AN byli přiřazeni i nemocní s aseptickými neuroinfekcemi tak, aby byli zastoupeni i pacienti s výrazněji porušenou HLB.

Osoby a metodika

Soubor

Náš soubor tvořilo 137 pacientů sledovaných na Neurologické klinice 3. LF UK a FN Královské Vinohrady pro různá onemocnění. Pacienti byli rozděleni na skupinu pacientů s RS společně s CIS (n = 50; věk 34 ± 9 let; 38 žen, 12 mužů), skupinu pacientů s AN (n = 24; věk 73 ± 7 ; 21 žen, 3 muži), skupinu

pacientů s aseptickými neuroinfekcemi (n = 17; věk 70 ± 8 ; 10 žen, 7 mužů), skupinu pacientů s neurologickými nezářlivými onemocněními (n = 36; věk 53 ± 18 ; 17 žen; 19 mužů) a skupinu symptomatických kontrol (n = 10; věk 34 ± 7 ; 7 žen, 3 muži). Diagnózu u pacientů zařazených do studie určoval zkušený neurolog.

Skupina RS zahrnovala jednak pacienty s diagnózou definitivní RS (n = 18) a jednak pacienty s CIS po první klinické epizodě (n = 32) na základě McDonaldových diagnostických kritérií platných v době lumbální punkce [26]. Do skupiny nemocných s AN byli zařazeni pacienti splňující kritéria NIA-AA (National Institute on Aging-Alzheimer's Association) [27]. Kognitivní funkce byly posuzovány pomocí české verze testu ACE-R (Addenbrooke's Cognitive Examination Revised), který hodnotí kognitivní funkce detailněji než test MMSE (Mini-Mental State Examination) [28–30]. Pro vyloučení intrakraniální patologie a určení velikosti hipokampu bylo provedeno u všech pacientů s AN vyšetření MR nebo CT v případech, kde vyšetření MR nebylo možné [31,32]. Další osoby jsme rozdělili na více skupin podle mezinárodní dohody [33]. Skupina pacientů se zánětlivými neurologickými onemocněními zahrnovala pacienty s aseptickými záněty, především neuroboreliózou a herpetickými infekcemi. Do skupiny pacientů s neurologickým onemocněním nezářlivého původu byli zařazeni pacienti s různými diagnózami s normálním počtem elementů v mozkomíšním moku. Skupinu symptomatických kontrol tvořili pacienti s neurologickými příznaky, ke kterým nebyly prokázány objektivní klinické nebo paraklinické nálezy vztahující se ke konkrétnímu neurologickému onemocnění. V mozkomíšním moku byl normální počet elementů a hodnoty Q_{alb} korigovaného na věk nepřevyšovaly referenční meze [33–35].

Vzorky mozkomíšního moku a krve odebrané v souladu s odpovídajícími doporučeními byly po odběru centrifugovány, alikvotovány po 0,5–1,0 ml do polypropylenových zkumavek a během 1,5 h v průměru uloženy při -80 °C [36]. Potřebné alikvoty byly rozmrazovány před analýzou.

Pacienti zařazení do studie podepsali informovaný souhlas. Výzkum byl schválen etickou komisí FN Královské Vinohrady.

Analytické metody

Pro stanovení hladin NFL v séru a mozkomíšním moku byla použita komerční ELISA

souprava NF-Light® Neurofilament ELISA (UmanDiagnostics, Umeå, Švédsko) určená pro výzkumné účely. Souprava byla zpracována podle instrukcí výrobce. Standardy i neznámé vzorky byly analyzovány v dubletu. Hodnoty NFL neznámých vzorků byly odečítány z šestibodové kalibrační křivky v její lineární části. Detekční limit byl 31 ng/l. V případě velmi nízkých hladin NFL v séru, které ležely pod detekčním limitem, byla pro statistické účely použita hodnota rovna detekčnímu limitu (31 ng/l). Dle údajů výrobce diagnostické soupravy hodnoty variačních koeficientů pro reprodukovatelnost v sérii pro tři různé hladiny koncentrací NFL (nízké, střední a vysoké) byly méně než 6 % a mezi sériemi méně než 9 %.

Koncentrace albuminu v séru a likvoru byla stanovena imunonefelometricky (IMMAGE imunochemický systém, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA). Z hodnot koncentrací albuminu v likvoru a séru (S) byl vypočítán albuminový kvocient ($Q_{alb} = \text{CSF-albumin}/\text{S-albumin}$).

Pro nedostatek biologického materiálu nemohly být v některých vzorcích stanoveny oba analyty (NFL a albumin).

Statistické metody

Vzhledem k tomu, že koncentrace NFL v séru a mozkomíšním moku v jednotlivých diagnostických skupinách nevykazovaly normální rozdělení, byl k hodnocení studovaných vztahů mezi různými proměnnými použit Spearmanův korelační koeficient. Statistické hodnocení bylo provedeno pomocí software Statistica, verze 12.0 (StatSoft CR s.r.o. Praha, ČR).

Výsledky

Hodnotili jsme vztahy mezi parametry hematolikorové bariéry (Q_{alb} a albumin v mozkomíšním moku) a hladinami NFL v mozkomíšním moku nebo v séru u jednotlivých skupin pacientů. Dále jsme provedli podobné analýzy poté, co jsme celý soubor rozdělili podle hodnoty Q_{alb} na skupinu s hodnotou $Q_{alb} \times 10^3 < 10$ a na skupinu s hodnotou $Q_{alb} \times 10^3 > 10$. Při volbě hraniční hodnoty pro Q_{alb} jsme vyšli z práce Kalma et al [25]. Uvedené vztahy byly analyzovány i v celém souboru jako celku.

Skupiny pacientů podle diagnóz

Hodnoty příslušných korelačních koeficientů a p hodnoty jsou uvedeny v tab. 1. V žádné skupině pacientů jsme neprokázali pozitivní korelaci mezi hladinami NFL v séru a hod-

Tab. 1. Korelace mezi hladinami lehkých řetězců neurofilament a albuminovým kvocientem u jednotlivých skupin pacientů s neurologickým onemocněním.

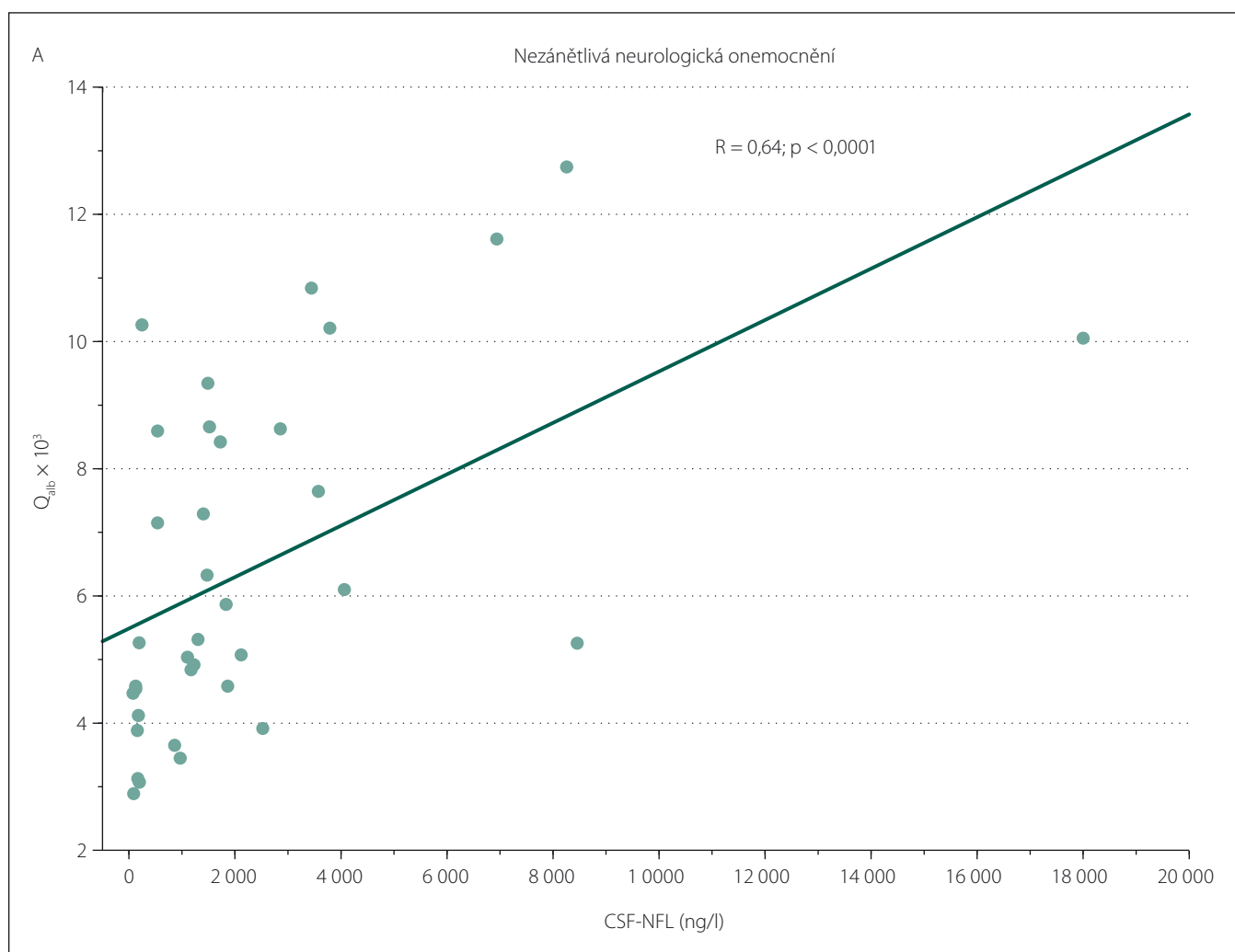
Korelace mezi	n	R	p
Symptomatické kontroly			
S-NFL vs. Q_{alb}	5	0,7	n. s.
S-NFL vs. CSF-albumin	5	0,7	n. s.
CSF-NFL vs. Q_{alb}	10	0,27	n. s.
CSF-NFL vs. CSF-albumin	10	0,26	n. s.
S-NFL vs. CSF-NFL	5	0,7	n. s.
Nezánětlivá neurologická onemocnění			
S-NFL vs. Q_{alb}	28	-0,01	n. s.
S-NFL vs. CSF-albumin	28	0,05	n. s.
CSF-NFL vs. Q_{alb}	36	0,64	< 0,0001
CSF-NFL vs. CSF-albumin	36	0,48	0,003
S-NFL vs. CSF-NFL	28	0,26	n. s.
Roztroušená skleróza a klinicky izolovaný syndrom			
S-NFL vs. Q_{alb}	27	-0,34	n. s.
S-NFL vs. CSF-albumin	27	-0,35	n. s.
CSF-NFL vs. Q_{alb}	49	-0,12	n. s.
CSF-NFL vs. CSF-albumin	49	-0,04	n. s.
S-NFL vs. CSF-NFL	28	0,27	n. s.
Alzheimerova nemoc			
S-NFL vs. Q_{alb}	24	-0,02	n. s.
S-NFL vs. CSF-albumin	24	-0,08	n. s.
CSF-NFL vs. Q_{alb}	24	0,15	n. s.
CSF-NFL vs. CSF-albumin	24	0,10	n. s.
S-NFL vs. CSF-NFL	24	0,38	n. s.
Aseptické neuroinfekce			
S-NFL vs. Q_{alb}	17	0,34	n. s.
S-NFL vs. CSF-albumin	17	0,25	n. s.
CSF-NFL vs. Q_{alb}	17	0,49	0,04
CSF-NFL vs. CSF-albumin	17	0,39	n. s.
S-NFL vs. CSF-NFL	17	0,72	0,001

CSF NFL – hladiny lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku; CSF-albumin – hladiny albuminu v mozkomíšním moku; n – počet pacientů; n. s. – není signifikantní; p – hladina významnosti; Q_{alb} – albuminový kvocient; R – Spearmanův korelační koeficient; S-NFL – hladiny lehkých řetězců neurofilament v séru; vs. – versus

notou Q_{alb} . Podobně nebyla zjištěna korelace mezi NFL v séru a albuminem v mozkomíšním moku. Ve skupině symptomatických kontrol jsme měli možnost vyšetřit hladiny NFL v séru pouze u pěti pacientů a hladiny NFL ležely pod detekčním limitem použité

metody ELISA. Proto je zapotřebí k posuzování příslušných hodnot korelačních koeficientů (S-NFL vs. Q_{alb} /CSF-albumin/CSF-NFL) uvedených v tab. 1 přistupovat s opatrností.

Jiné výsledky se týkaly nálezů v likvoru. Nalezli jsme souvislost mezi koncentrací NFL



Graf 1A. Korelace mezi albuminovým kvocientem a hladinami lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku u nezáporných neurologických onemocnění.

CSF-NFL – hladiny lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku; Q_{alb} – albuminový kvocient

Graph 1A. Relationship between albumin quotient and neurofilament light chain levels in the cerebrospinal fluid in patients with non-inflammatory neurological diseases.

CSF-NFL – neurofilament light chain levels in cerebrospinal fluid; Q_{alb} – albumin quotient

v likvoru a Q_{alb} ve skupině pacientů s nezápornými neurologickými onemocněními a skupině pacientů s neuroinfekcemi (graf 1A,B). Mezi pacienty s nezápornými neurologickými onemocněními byla jedna 78letá žena s výrazně zvýšenými hodnotami hladin NFL v likvoru. Měla cervikální myelopatii a klinicky němé meningeomy (CSF-NFL 18 000 ng/l, S-NFL 720 ng/l). Ve skupině pacientů s neuroinfekcí korelovaly hladiny NFL v séru a mozkomíšním moku (graf 2).

Skupiny pacientů podle hodnoty Q_{alb}

Při rozdělení pacientů podle hodnoty Q_{alb} nekorelovaly sérové hladiny NFL s hodnotou

Q_{alb} nebo s albuminem v mozkomíšním moku ani ve skupině s hodnotou $Q_{alb} \times 10^3 < 10$, ani s hodnotami $Q_{alb} \times 10^3 > 10$. Ve skupině s hodnotami $Q_{alb} \times 10^3 < 10$ byla nalezena pozitivní korelace mezi hladinami NFL v likvoru a Q_{alb} . Shodně v obou skupinách byla prokázána pozitivní korelace mezi hladinami NFL v séru a v mozkomíšním moku (tab. 2).

Soubor pacientů jako celek

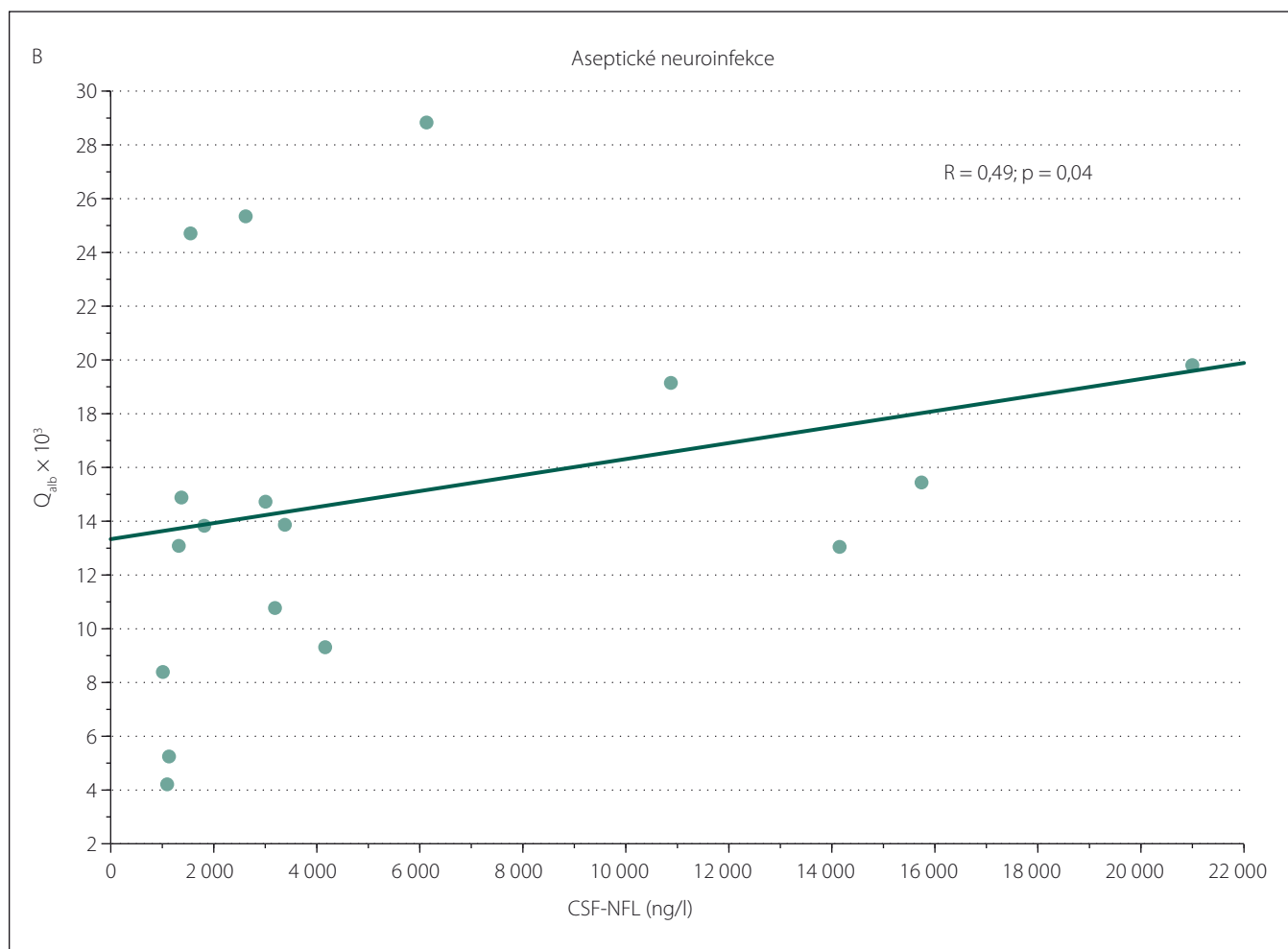
Při hodnocení souboru pacientů jako celku byla potvrzena absence vztahu mezi sérovými hladinami NFL a Q_{alb} , popř. hladinami albuminu v mozkomíšním moku, a naopak výrazně byl vyjádřen vztah mezi hladinami

NFL v mozkomíšním moku a Q_{alb} nebo albuminem v mozkomíšním moku. Při analýze celého souboru byla pozorována pozitivní korelace mezi hladinami NFL v séru a mozkomíšním moku (tab. 3).

Hodnoty hladin NFL v séru a mozkomíšním moku jsou uvedeny v tab. 4. Analýza hladin NFL v séru a mozkomíšním moku u AN a časných stádií RS byla předmětem samostatných publikací [5,12].

Diskuze

Moderní způsob testování biomarkerů původem z mozkové tkáně směřuje k jejich vyšetřování v séru, které by nahradilo stanovení v mozkomíšním moku. Tento trend



Graf 1B. Korelace mezi albuminovým kvocientem a hladinami lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku u pacientů s aseptickými neuroinfekcemi.

CSF-NFL – hladiny lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku; Q_{alb} – albuminový kvocient

Graph 1B. Relationship between albumin quotient and neurofilament light chain levels in the cerebrospinal fluid in patients with aseptic neuroinfections.

CSF-NFL – neurofilament light chain levels in cerebrospinal fluid; Q_{alb} – albumin quotient

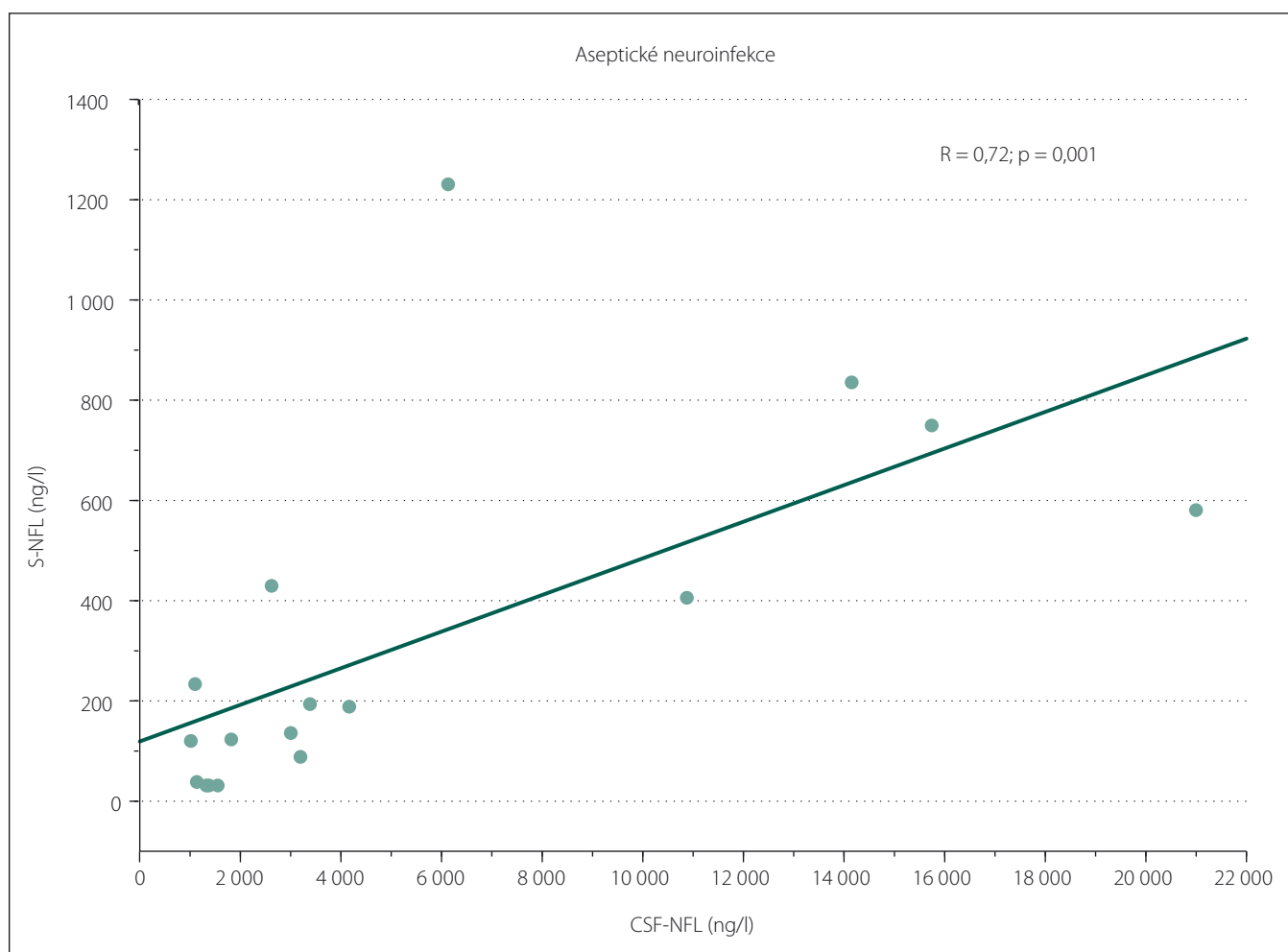
je pro neurologické pacienty přínosný, neboť se nemusí podrobovat invazivní lumbální punkci. Určitou nevýhodou může být, že hodnoty některých biomarkerů v séru mohou být ovlivňovány i stavem bariér v nervovém systému. Výsledky naší studie naznačují, že u vybraných neurologických onemocnění propustnost hemato-likvorové bariéry nepředstavuje problém při vyšetření NFL v séru. Potvrdili jsme a doplnili tak výsledky Kalma et al [25], kteří ve své práci zkoumali vztah mezi hladinami NFL a hodnotou Q_{alb} bez souvislosti s konkrétním neurologickým onemocněním.

V předkládané studii nebyla u vybraných neurologických onemocnění prokázána pozitivní korelace mezi sérovými hladinami NFL a Q_{alb} jako ukazatelem stavu HLB, popř.

izolovanými hodnotami albuminu v likvoru. U RS mohou být hladiny albuminu v mozkomíšním moku nebo Q_{alb} zvýšeny u 12–23 % pacientů [37]. Předpokládá se, že poškození bariér nervového systému u RS je přechodného rázu, které se může opakovat ve stejných nebo odlišných oblastech CNS [38]. Byla popsána i souvislost mezi vyššími hladinami Q_{alb} při nástupu onemocnění a atrofií mozku společně s vyšší mírou funkčního omezení [39]. Dalším sledovaným onemocněním, u něhož jsme nenašli vztah mezi sérovými NFL a Q_{alb} , byla AN. Změny v HLB nejsou typickým nálezem u AN a jsou popisovány pouze u některých pacientů. Metaanalýza 20 studií prokázala mírné statisticky významné zvýšení Q_{alb} u AN ve srovnání s kontrolami [21].

Izolovaná porucha HLB je nespecifickým projevem demencí bez ohledu na jejich etiologii [24]. Na rozdíl od AN představují neuroinfekce skupinu onemocnění, u nichž porucha HLB je typický nález [40]. Signifikantní korelace s hladinami NFL v séru nebyla nalezena ani u této skupiny, v níž byl zastoupen největší počet zvýšených hodnot Q_{alb} . Pozitivní korelace mezi sérovými NFL a Q_{alb} chybí nejen u jednotlivých skupin pacientů podle diagnóz, ale ani při rozdělení pacientů podle závažnosti porušení HLB nebo při hodnocení souboru jako celku nebyla zjištěna souvislost mezi Q_{alb} a NFL v séru.

Přítomnost NFL jako neuronálně specifického proteinu a jeho přestup do krve může být vysvětlován různými mechanismy. Jed-



Graph 2. Korelace mezi hladinami lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku a séru u pacientů s aseptickými neuroinfekcemi.

CSF-NFL – hladiny lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku; S-NFL – hladiny lehkých řetězců neurofilament v séru

Graph 2. Relationship between levels of neurofilament light chains in cerebrospinal fluid and serum in patients with aseptic neuroinfections.

CSF-NFL – neurofilament light chain levels in cerebrospinal fluid; S-NFL – neurofilament light chain levels in serum

nou z možností je transport proteinů mozkového původu z mozkomíšního moku jeho resorpcí do žilní krve a může se uplatňovat i glymfatický systém [41]. Ze studií Reibera et al [42,43] ale vyplývá, že změny koncentrace proteinů pocházejících z mozkové tkáně v krvi nelze vysvětlit změnami jejich koncentrací v mozkomíšním moku. Nabízí se i možnost přímého přestupu z mozku do krve přes HEB. V mozku jsou popisovány oblasti v tzv. cirkumventrikulárních orgánech, kde takový průnik je v omezeném množství možný, nebo v lokalitách, kde je porušena neurovaskulární jednotka [23,41,44]. Nelze vyloučit difuzi molekul dokonce i přes intaktní HEB v některých oblastech vyššího hematolikorového gradientu. Přes-
tup mozkových proteinů bezprostředně do krve bez účasti likvorového kompartmentu

by mohl být jedním z vysvětlení chybějící korelace mezi sérovými hladinami NFL a Q_{alb} .

Vztah mezi hladinami NFL v likvoru a Q_{alb} nebyl u jednotlivých diagnostických skupin uniformní. Pozitivní korelace byla zřejmá ve skupině pacientů s neznámými neurologickými onemocněními a dále, i když méně vyjádřena ve skupině pacientů s aseptickými neuroinfekcemi, kde převažovaly vyšší hodnoty Q_{alb} . Podobný vztah byl nedávno prokázán i u HIV pozitivních pacientů jak neuroasymptomatických neléčených, tak neurosymptomatických léčených pacientů a stejně i u HIV negativních kontrol [45]. Na prokázané korelaci mezi hodnotami Q_{alb} a koncentracemi NFL v mozkomíšním moku těchto pacientů se může podílet porucha HLB i současné poškození neuronů,

aniž mezi oběma patologickými mechanismy existuje přímá spojitost. Souvislost mezi hladinami NFL v likvoru a Q_{alb} , popř. albuminem v likvoru nebyla prokázána u našich pacientů s onemocněními s projevy neurodegenerace, kde předpokládáme, že probíhají procesy směřující k narušení axonálních struktur. Naše výsledky naznačují, že vztah mezi likvorovými hladinami NFL a Q_{alb} může být modifikován odlišností neuropatologických změn charakteristických pro jednotlivá neurologická onemocnění. Míra poškození HLB a axonů se u různých neurologických onemocnění vyvíjí v rozdílné intenzitě. Pozitivní korelace mezi likvorovými hladinami a Q_{alb} je popisována u NFL i u některých dalších specifických mozkových proteinů a naopak se můžeme setkat i s absencí tohoto vztahu [46–48].

Vztah mezi hladinami NFL v séru a mozkomíšním moku je v literatuře popisován opakovaně. V dosud publikovaných studiích převažují nálezy pozitivní korelace hladin NFL mezi oběma biologickými tekutinami [16,22,49], ale objevují se i nálezy negativní, kde vztah není prokázán [49]. V souboru našich pacientů hodnoceném jako celek sérové i likvorové hladiny NFL spolu korelovaly. Rovněž při analýze, kde kritériem byla výše Q_{alb} , byla asociace mezi likvorovými a sérovými hladinami NFL pozorována. Ve skupině s hodnotami $Q_{alb} \times 10^3 > 10$ i přes nižší počet pacientů vykazovala mnohem těsnější vztah ve srovnání se skupinou s hodnotami $Q_{alb} \times 10^3 < 10$. Při rozdělení pacientů podle diagnóz nebyl výsledek tak jednoznačný. Hodnocení vztahu mezi hladinami NFL v séru a likvoru u skupin pacientů s vybranými neurologickými onemocněními prokázalo signifikantní korelaci pouze ve skupině aseptických neuroinfekcí. Chybějící vztah mezi hladinami v séru a likvoru by mohl být vysvětlen i použitou metodikou. V této studii jsme hladiny NFL v mozkomíšním moku i v séru vyšetřovali stejnou komerčně dostupnou soupravou, která pro stanovení v séru má omezenou citlivost. V nejnovějších studiích používali autoři k analýze séra citlivějších metod na bázi Simoa (single-molecule array), pomocí nichž jsou zejména v oblasti nižších koncentrací NFL v séru získávány přesnější výsledky [9,11]. Uvedené metody u nás nejsou běžně dostupné a vzhledem k finanční náročnosti budou zatím těžko využitelné pro rutinní stanovení. Použitím citlivějších metod, jako je Simoa, popř. elektrochemiluminiscence, pro stanovení NFL je dosahováno vyšších hodnot korelačních koeficientů pro srovnání hladin NFL v séru a mozkomíšním moku [11].

Tab. 2. Korelace mezi hladinami lehkých řetězců neurofilament v séru nebo mozkomíšním moku a albuminovým kvocientem u skupin pacientů s $Q_{alb} \times 10^3 < 10$ nebo s $Q_{alb} \times 10^3 > 10$.

Korelace mezi	n	R	p
$Q_{alb} \times 10^3 < 10$			
S-NFL vs. Q_{alb}	80	-0,11	n. s.
S-NFL vs. CSF-albumin	80	-0,10	n. s.
CSF-NFL vs. Q_{alb}	114	0,20	0,04
CSF-NFL vs. CSF-albumin	114	0,12	n. s.
S-NFL vs. CSF-NFL	80	0,24	0,03
$Q_{alb} \times 10^3 > 10$			
S-NFL vs. Q_{alb}	21	0,33	n. s.
S-NFL vs. CSF-albumin	21	0,20	n. s.
CSF-NFL vs. Q_{alb}	22	0,02	n. s.
CSF-NFL vs. CSF-albumin	22	-0,21	n. s.
S-NFL vs. CSF-NFL	21	0,7	0,0006

CSF-NFL – hladiny lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku; CSF-albumin – hladiny albuminu v mozkomíšním moku; n – počet pacientů; n. s. – není signifikantní; S-NFL – hladiny lehkých řetězců neurofilament v séru; Q_{alb} – albuminový kvocient; p – hladina významnosti; R – Spearmanův korelační koeficient

Tab. 3. Korelace mezi hladinami lehkých řetězců neurofilament a albuminovým kvocientem v celém souboru pacientů.

Korelace mezi	n	R	p
S-NFL vs. Q_{alb}	101	0,05	n. s.
S-NFL vs. CSF-albumin	101	0,06	n. s.
CSF-NFL vs. Q_{alb}	136	0,35	0,00002
CSF-NFL vs. CSF-albumin	136	0,31	0,0002
S-NFL vs. CSF-NFL	102	0,35	< 0,001

CSF-NFL – hladiny lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku; CSF-albumin – hladiny albuminu v mozkomíšním moku; n – počet pacientů; n. s. – není signifikantní; S-NFL – hladiny lehkých řetězců neurofilament v séru; Q_{alb} – albuminový kvocient; p – hladina významnosti; R – Spearmanův korelační koeficient

Tab. 4. Hladiny lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku a v séru u jednotlivých skupin pacientů.

Skupina	S-NFL (ng/l) medián (interkvartilové rozmezí)	CSF-NFL (ng/l) medián (interkvartilové rozmezí)
symptomatické kontroly	31 (31–31) (n = 5)	180 (129–205) (n = 10)
nezánětlivá neurologická onemocnění	47 (31–168) (n = 28)	1 351 (221–2 690) (n = 36)
RS a klinicky izolovaný syndrom	62 (31–280) (n = 28)	711 (340–1 569) (n = 50)
Alzheimerova nemoc	38 (31–172) (n = 24)	3 557 (1 981–4 899) (n = 24)
aseptické neuroinfekce	188 (89–430) (n = 17)	3 007 (1 376–6 135) (n = 17)

CSF-NFL – hladiny lehkých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku; n – počet pacientů; S-NFL – hladiny lehkých řetězců neurofilament v séru

Závěr

Naše studie naznačuje, že sérové hladiny NFL nejsou přímo ovlivněny permeabilitou HLB posuzované Q_{alb} u neurodegenerativních onemocnění a neuroinfekcí. Naopak na vztah mezi likvorovými hladinami NFL a hodnotou Q_{alb} nebo sérovými hladinami NFL může mít vliv charakter neuropatologických změn u jednotlivých neurologických onemocnění. U onemocnění s účastí neurodegenerace nebyl pozorován vztah mezi hladinami CSF NFL a Q_{alb} , zatímco u heterogenní skupiny pacientů se zánětlivými nebo nezářlivými neurologickými onemocněními oba parametry pozitivně korelovaly.

Literatura

- Gotow T. Neurofilaments in health and disease. *Med Electron Microsc* 2000; 33(4): 173–199.
- Hjalmarsson C, Bjerke M, Andersson B et al. Neuronal and glia-related biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic stroke. *J Cent Nerv Syst Dis* 2014; 6: 51–58. doi: 10.4137/JCNSD.S13821.
- Fialova L, Malbohan I. Neuronal cytoskeleton components in cerebrospinal fluid in selected neurological diseases. In Slavik V, Dolezal T (eds). *Cerebrospinal fluid: functions, composition and disorders*. New York: Nova Science Publishers 2012; 65–86.
- Piřha J. Biomarkery roztroušené sklerózy – současné možnosti a perspektivy. *Cesk Slov Neurol N* 2015; 78/111(3): 269–273.
- Fialova L, Bartos A, Svarcova J et al. Serum and cerebrospinal fluid light neurofilaments and antibodies against them in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2013; 262(1–2): 113–120. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.06.010.
- Teunissen CE, Iacobaeus E, Khademi M et al. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology* 2009; 72(15): 1322–1329. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181a0fe3f.
- Norgren N, Rosengren L, Stigbrand T. Elevated neurofilament levels in neurological diseases. *Brain Res* 2003; 987(1): 25–31.
- Disanto G, Adiatori R, Dobson R et al. Serum neurofilament light chain levels are increased in patients with a clinically isolated syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016; 87(2): 126–129. doi: 10.1136/jnnp-2014-309690.
- Mattsson N, Andreasson U, Zetterberg H et al. Association of plasma neurofilament light with neurodegeneration in patients with Alzheimer disease. *JAMA Neurol* 2017; 74(5): 557–566. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.6117.
- Kuhle J, Barro C, Disanto G et al. Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Mult Scler* 2016; 22(12): 1550–1559.
- Kuhle J, Barro C, Andreasson U et al. Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54(10): 1655–1661. doi: 10.1515/cclm-2015-1195.
- Fialova L, Bartos A, Svarcova J. Neurofilaments and tau proteins in cerebrospinal fluid and serum in dementias and neuroinflammation. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2017; 161(3): 286–295. doi: 10.5507/bp.2017.038.
- Havrdová E. Roztroušená skleróza. *Cesk Slov Neurol N* 2008; 71/104(2): 121–132.
- Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2014; 10(4): 225–238. doi: 10.1038/nrneuro.2014.37.
- Mareš J. Význam časné diagnostiky a terapie v životní perspektivě pacientů s roztroušenou sklerózou. *Med praxi* 2013; 10(4): 149–153.
- Disanto G, Barro C, Benkert P et al. Serum Neurofilament light: a biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2017; 81(6): 857–870. doi: 10.1002/ana.24954.
- Khalil M, Enzinger C, Langkammer C et al. CSF neurofilament and N-acetylaspartate related brain changes in clinically isolated syndrome. *Mult Scler* 2013; 19(4): 436–442. doi: 10.1177/1352458512458010.
- Rektorová I. Neurodegenerativní demence. *Cesk Slov Neurol N* 2009; 72/105(2): 97–109.
- Yuan A, Nixon RA. Specialized roles of neurofilament proteins in synapses: Relevance to neuropsychiatric disorders. *Brain Res Bull* 2016; 126(Pt 3): 334–346. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.09.002.
- Bartoš A, Čechová L, Švarcová J et al. Likvorový triple (tau protein a beta-amyloid) v diagnostice Alzheimerovy-Fischerovy nemoci. *Cesk Slov Neurol N* 2012; 75/108(5): 587–594.
- Olsson B, Lautner R, Andreasson U et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2016; 15(7): 673–684. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00070-3.
- Bacioglu M, Maia LF, Preische O et al. Neurofilament light chain in blood and CSF as marker of disease progression in mouse models and in neurodegenerative diseases. *Neuron* 2016; 91(2): 494–496. doi: 10.1016/j.neuron.2016.07.007.
- Piřha J. Bariéry nervového systému za fyziologických a patologických stavů. *Cesk Slov Neurol N* 2014; 77/110(5): 553–559.
- Bretschneider J, Claus A, Kassubek J et al. Isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. *J Neurol* 2005; 252(9): 1067–1073.
- Kalm M, Boström M, Sandelius A et al. Serum concentrations of the axonal injury marker neurofilament light protein are not influenced by blood-brain barrier permeability. *Brain Res* 2017; 1668: 12–19. doi: 10.1016/j.brainres.2017.05.011.
- Polman CH, Reingold SC, Edan G et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the „McDonald Criteria“. *Ann Neurol* 2005; 58(6): 840–846.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H et al. 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* 2011; 7(3): 263–269. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
- Mioshi E, Dawson K, Mitchell J et al. The Addenbrooke's Cognitive Examination Revised (ACE-R): a brief cognitive test battery for dementia screening. *Int J Geriatr Psychiatry* 2006; 21(11): 1078–1085.
- Bartoš A, Raisová M and Kopeček M. Amendment of the Czech Addenbrooke's cognitive examination (ACE-CZ). *Cesk Slov Neurol N* 2011; 74/107(6): 681–684.
- Bartoš A, Raisová M and Kopeček M. Důvody a průběh novelizace české verze Addenbrookského kognitivního testu (ACE-CZ). *Cesk Slov Neurol N* 2011; 74/107(6): e1–e5.
- Scheltens P, Leys D, Barkhof F et al. Atrophy of medial temporal lobes on MRI in „probable“ Alzheimer's disease and normal ageing: diagnostic value and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55(10): 967–972.
- Bartoš A, Zach P, Diblíková F et al. Visual rating of medial temporal lobe atrophy on magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease. *Psychiatrie* 2007; 11 (Suppl 3): 49–52.
- Teunissen C, Menge T, Altintas A et al. Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarker studies in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2013; 19(13): 1802–1809. doi: 10.1177/1352458513488232.
- Zima T. Laboratorní diagnostika. 3. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén 2013.
- Deisenhammer F, Bartos A, Egg R et al. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *Eur J Neurol* 2006; 13(9): 913–922.
- Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology* 2009; 73(22): 1914–1922. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c47cc2.
- LeVine SM. Albumin and multiple sclerosis. *BMC Neurol* 2016; 16: 47. doi: 10.1186/s12883-016-0564-9.
- Schenk GJ, de Vries HE. Altered blood-brain barrier transport in neuro-inflammatory disorders. *Drug Discov Today Technol* 2016; 20: 5–11. doi: 10.1016/j.ddtec.2016.07.002.
- Uher T, Horakova D, Tyblová M et al. Increased albumin quotient (Q_{alb}) in patients after first clinical event suggestive of multiple sclerosis is associated with development of brain atrophy and greater disability 48 months later. *Mult Scler* 2016; 22(6): 770–781. doi: 10.1177/1352458515601903.
- Bednarova J. Cerebrospinal-fluid profile in neuroborreliosis and its diagnostic significance. *Folia Microbiol (Praha)* 2006; 51(6): 599–603.
- Kawata K, Liu CY, Merkel SF et al. Blood biomarkers for brain injury: What are we measuring? *Neurosci Biobehav Rev* 2016; 68: 460–473. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.05.009.
- Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 2001; 310(2): 173–186.
- Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci* 2003; 21(3–4): 79–96.
- Shaw G. The use and potential of pNF-H as a general blood biomarker of axonal loss: an immediate application for CNS injury. In: Kobeissy FH. *Brain neurotrauma: molecular, neuropsychological, and rehabilitation aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2015.
- Anesten B, Yilmaz A, Hagberg L et al. Blood-brain barrier integrity, intrathecal immunoreactivity, and neuronal injury in HIV. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2016; 3(6): e300.
- Sussmuth SD, Reiber H, Tumani H. Tau protein in cerebrospinal fluid (CSF): a blood-CSF barrier related evaluation in patients with various neurological diseases. *Neurosci Lett* 2001; 300(2): 95–98.
- Liguori C, Olivola E, Pierantozzi M et al. Cerebrospinal-fluid Alzheimer's disease biomarkers and blood-brain barrier integrity in a natural population of cognitively intact Parkinson's disease patients. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2017; 16(3): 339–345. doi: 10.2174/1871527316666161205123123.
- Kuhle J, Leppert D, Petzold A et al. Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology* 2011; 76(14): 1206–1213. doi: 10.1212/WNL.0b013e31821432ff.
- Gaiottino J, Norgren N, Dobson R et al. Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases. *PLoS One* 2013; 8(9): e75091. doi: 10.1371/journal.pone.0075091.