

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Detekce autoprotilátek anti-MAG IgM a
autoprotilátek anti-GM IgM, IgG u pacientů
s periferními neuropatiemi**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Veronika Kunová
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lucie Roubalová
Termín odevzdání práce:	2. května 2013

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s využitím níže uvedené literatury.

V Olomouci dne 2.5.2013

Veronika Kunová

Děkuji Mgr. Lucii Roubalové za pomoc s vypracováním diplomové práce, odborné vedení i psychickou podporu. Všem členům oddělení Klinické biochemie také děkuji za jejich pomoc a vstřícnost. Děkuji své rodině za podporu v průběhu celého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Veronika Kunová
Název práce	Detekce autoprotilátek anti-MAG IgM a autoprotilátek anti-GM IgM, IgG u pacientů s periferními neuropatiemi
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Roubalová
Rok obhajoby práce	2013

Abstrakt

Periferní neuropatie představují rozsáhlou skupinu onemocnění, jejichž příčinou mohou být diabetes mellitus, alkoholismus, metabolické, autoimunitní choroby a další. Stanovení anti-gangliosidových protilátek má velký klinický význam pro určení diagnózy u pacientů s autoimunitní periferní neuropatií. Nejčastější autoimunitní neuropatií je Guillain-Barrého syndrom, u kterého se anti-GM protilátky vyskytují. Periferní neuropatie se také pojí s monoklonální gamapatií nejasného významu.

Asi polovina osob se symptomy polyneuropatie a výskytem monoklonální gamapatie má v krvi monoklonální imunoglobulin IgM, který má charakter protilátky proti myelin asociovanému glykoproteinu (MAG), jenž je součástí myelinové pochvy periferních nervových vláken. Důsledkem je segmentální demyelinizace vedoucí k degeneraci nervových vláken.

Cílem práce je stanovení protilátek anti-GM ve třídě IgG, IgM a anti-MAG ve třídě IgM metodou ELISA, zavedení obou metod do rutinní laboratorní praxe a vypracování diskuse v porovnání s dostupnou literaturou.

Klíčová slova	Guillain-Barrého syndrom, gangliosidy, monoklonální gamapatie asociované s periferní neuropatií, myelin asociovaný glykoprotein, ELISA
Počet stran	70
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographic identification:

Autor's first name and surname	Bc. Veronika Kunová
Title	Detection of autoantibodies for anti-MAG IgM and autoantibodies for anti-GM IgM, IgG in patients with peripheral neuropathy
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Lucie Roubalová
The year of presentation	2013

Abstrakt

Peripheral neuropathies represent a large group of diseases caused by diabetes mellitus, alcoholism, metabolic or autoimmune disease and etc. The determination of anti-ganglioside antibodies has great clinical importance for diagnosis of patients with autoimmune peripheral neuropathy. Anti-GM antibodies occur in patients with Guillain-Barré syndrome which is the most frequent autoimmune neuropathy. Peripheral neuropathy is also associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance.

About half of patients with symptoms of neuropathy and monoclonal gammopathy produce monoclonal immunoglobulin IgM, which reacts with myelin associated glycoprotein (MAG). This pathology leading to nervous segmental demyelination.

The aim of this thesis is to determine anti-GM IgG, IgM and anti-MAG IgM antibodies by ELISA, to put both methods into laboratory practice and create the discussion in comparison with available literature.

Keywords	Guillain-Barré syndrom, gangliosides, monoclonal gammopathy associated with peripheral neuropathy, myelin associated glycoprotein, ELISA
Number of pages	70
Number of appendices	0
Language	czech

OBSAH

1	CÍLE PRÁCE	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Gangliosidy	9
2.1.1	Obecná charakteristika	9
2.1.2	Funkce gangliosidů	10
2.1.3	Protilátky proti gangliosidům	10
2.1.4	Autoimunitní periferní neuropatie	13
2.1.5	Guillain –Barrého syndrom (GBS)	14
2.1.5.1	Obecná charakteristika	14
2.1.5.2	Podtypy GBS	15
2.1.5.3	Projevy GBS	16
2.1.5.4	Diagnostika GBS	17
2.1.5.5	Patofyziologie GBS	17
2.1.5.6	Léčba GBS	21
2.1.5.7	Epidemiologie	21
2.2	MAG (myelin asociovaný glykoprotein)	22
2.2.1	Struktura MAG	22
2.2.2	Funkce MAG	23
2.2.3	Patologie MAG	23
2.2.4	Monoklonální gamapatie	24
2.2.4.1	Obecná charakteristika	24
2.2.4.2	Diagnostika monoklonální gamapatie	25
2.2.4.3	Monoklonální gamapatie nejasného významu asociované s periferní neuropatií	25
2.2.4.3.1	Klinické projevy	26
2.2.4.3.2	Léčba	26
2.2.4.3.3	Patofyziologie	27
2.2.4.3.4	Epidemiologie	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1	Reagencie	29
3.2	Biologický materiál	31
3.2.1	Vzorky pacientů pro stanovení protilátek proti gangliosidům	31
3.2.2	Vzorky pacientů pro stanovení protilátek proti myelin asociovanému glykoproteinu MAG	31
3.3	ELISA	32
3.3.1	Detekce anti-gangliosidových protilátek	32
3.3.2	Detekce anti-MAG protilátek	35
4	VÝSLEDKY	40
4.1	Stanovení protilátek proti gangliosidům u pacientů s periferními neuropatiemi	40
4.1.1	Způsob vyhodnocení	40

4.1.2	Vyhodnocení.....	42
4.2	Stanovení protilátek proti MAG u pacientů s prokázanou monoklonální gamapatií.....	46
4.2.1	Způsob vyhodnocení	46
4.2.2	Vyhodnocení.....	47
5	DISKUSE.....	50
5.1	Anti-gangliosidové protilátky	50
5.2	Anti-MAG protilátky	54
6	ZÁVĚR	57
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59
7.1	Seznam hypertextových odkazů	68
8	SEZNAM ZKRATEK	70

1 Cíle práce

- Vypracovat literární rešerši na dané téma.
- Vybrat pro stanovení autoprotilátek vhodné pacienty na základě dostupné literatury, detekovat anti-gangliosidové protilátky ve třídě IgG, IgM a protilátky anti-MAG ve třídě IgM u vybraných pacientů.
- Zavést obě metody do rutinní laboratorní praxe na oddělení Klinické biochemie FN Olomouc. Pro zavedení obou metod je potřeba vytvořit standardní operační postup vyšetřovací ve zkratce SOPV.
- Prokázat užitečnost obou technik.
- Objasnit hypotézu: „Pokud je monoklonální gamapatie prokazatelně způsobena protilátkami anti-MAG IgM, lze tyto pacienty cíleně léčit odlišným způsobem a pokud ano, jak je ovlivněna možnost vyléčení“.
- Zhodnotit výsledky a sepsat diskusi na základě dostupné literatury.

2 Teoretická část

2.1 Gangliosidy

2.1.1 Obecná charakteristika

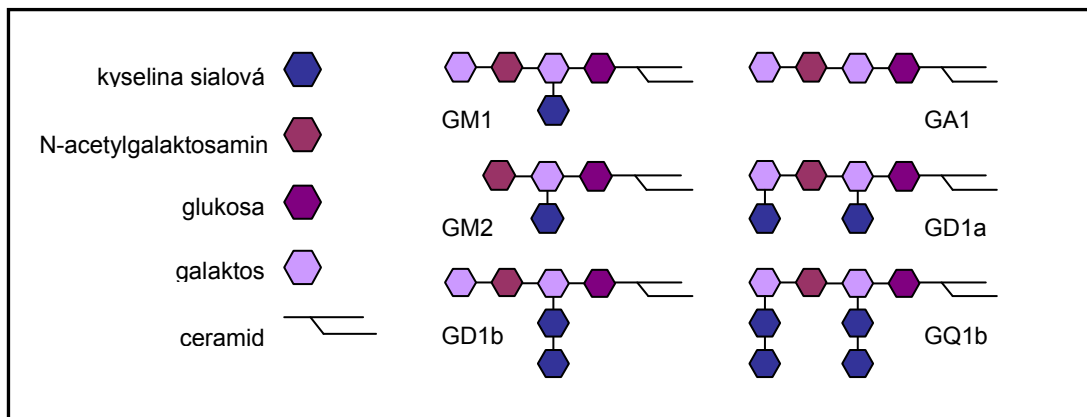
V roce 1942 izoloval Němec Ernst Klenk z mozkových ganglií ovce novou třídu glykolipidů bohatých na karbohydráty, které pojmenoval gangliosidy (Svennerholm, 1964).

Gangliosidy se řadí do skupiny glykosfingolipidů (Malíčková et al., 2007), které se nachází hlavně v buněčných membránách a zvláště bohaté jsou membrány nervového systému přesněji myelinové pochvy a axolema (Steck & Kappos, 1994). Gangliosidy mají jedinečné zastoupení v periferních nervech a jsou uspořádány ve specializovaných funkčních mikrodoménách zvané lipidové rafty (van Doorn et al., 2008).

V nervových buňkách centrálního i periferního nervového systému se nejvíce objevují gangliosidy GM1, GD1a, GD1b a GT1, kde fungují jako ligandy stability myelinu a účastní se řízení regenerace nervu prostřednictvím vazby na glykoprotein asociovaný s myelinem zvaný MAG (myelin associated glycoprotein). Místa bohatá na gangliosidy jsou oblasti Ranvierových zářezů a presynaptická zakončení nervů (Malíčková et al., 2007). V motorických nervech jsou zastoupeny gangliosidy GM1 a GD1, v senzitivních nervech převládají obecně disialogangliosidy (především GD1, GD2 a GD3), v kraniálních motorických nervech inervující extraokulární svaly se hojně vyskytují GQ1 (Caudie, 2000; Ogawa-Goto & Abe, 1998).

Gangliosidy jsou syntetizovány v Golgiho aparátu (Steck & Kappos, 1994). Molekula gangliosidů se skládá z hydrofóbního ceramidu, což je N-acetylovaný sfingosin. Na ceramid je navázán hydrofilní oligosacharidový řetězec, jenž je složen z jednoho až čtyř monosacharidů (z hexózu např. glukóza, galaktóza) a kyseliny sialové. Hydrofóbní ceramid je ponořen do lipidové dvouvrstvy buněčné membrány, zatímco hydrofilní sacharidová část slouží jako autoantigen pro protilátky se nacházející se na povrchu buněk (Willison & Yuki, 2002; Yuki, 2005). Schématické složení jednotlivých gangliosidů je znázorněno na „Obr.1“.

Gangliosidy jsou velmi různorodé molekuly mající složitou nomenklaturu (Malíčková et al, 2007). Dnes je popsáno více než 100 gangliosidů (Malíčková et al, 2007; Yuki, 1998).



Obrázek 1: Schématické znázornění složení gangliosidů (převzato a upraveno dle předlohy Willison & Yuki, 2002; Malíčková et al., 2007)

2.1.2 Funkce gangliosidů

Gangliosidy hrají důležitou roli v biologických funkcích jako je buněčná diferenciaci a růst, modulace signálního přenosu nebo imunitní odpověď, zároveň slouží jako receptory bakteriálních toxinů (Malíčková et al., 2007; Ariga, 2011). Díky molekulární interakci proteinů plazmatické membrány jsou glykany gangliosidů zapojeny do mnoha buněčných procesů, kterými jsou buněčné adheze, intracelulární signalizace, interakce mezi myelinem a axonem prostřednictvím lektinů imunoglobulinové povahy vázající sialovou kyselinu (Siglec - sialic acid binding immunoglobulin like lectins), modulace funkce NK buněk (natural killer) a zánětlivé procesy (Kaida & Kusunoki, 2010; Lopez & Schnaar, 2009).

2.1.3 Protilátky proti gangliosidům

Protilátky (imunoglobuliny) jsou glykoproteiny, produkované plazmatickými B buňkami jako imunitní odpověď na přítomnost antigenu. Funkcí protilátek je rozpoznat antigeny, které zapříčinily jejich produkci a vytvořit vazbu s antigenními determinanty zvané epitopy. Vytvořený imunokomplex zajistí působením protilátek zneškodnění antigenu neutralizací, opsonizací nebo aktivaci komplementu (Hořejší & Bartůňková, 2009).

Schopnost imunitního systému rozpoznat vlastní antigeny a reagovat s nimi je fyziologický proces. O autoimunitních onemocněních mluvíme tehdy, vede-li autoimunitní reakce k poškození vlastních tkání. Autoimunitní odpověď může být humorálního i buněčného typu. Jedná-li se o humorální autoimunitní odpověď dochází k tvorbě autoprotilátek, které mají podíl na tkáňovém poškození působením

cytotoxických mechanismů či produkcí a ukládáním imunokomplexů. Reakce buněčného typu jsou typické tvorbou zánětu působením T lymfocytů, jejich cytokinových produktů a aktivací makrofágů. Podmínkou vzniku autoimunitních onemocnění je překonání autotolerance, tedy mechanismů zachovávajících imunitní reakci vůči vlastním tkáním ve fyziologické rovnováze. Autoimunitní choroby vznikají postupně a jejich vývoj může být dlouhodobý v řádech několika měsíců či let (Hořejší & Bartůňková, 2009). U těchto onemocnění je stěžejním diagnostickým znakem výskyt protilátek (Hořejší & Bartůňková, 2009; internet 2). Selhání autoimunitní reakce je důsledkem kombinace vnitřních faktorů (genetické, hormonální) a faktorů zevního prostředí (infekce, UV záření, chemikálie, léky, stres) (Hořejší & Bartůňková, 2009; internet 1). Právě infekcím je přiřkládán největší podíl při spuštění autoimunitní reakce. Infekce se může podílet na spuštění autoimunitní reakce různými mechanismy, jako jsou například molekulární mimikry, které představují nejzávažnější patofyziologický způsob vzniku autoimunitních reakcí zahrnující i tvorbu protilátek proti gangliosidům (Yuki, 2005; Ang et al., 2004). Molekulární mimikry mezi mikrobiálními antigeny a hostitelskou tkání tak tvoří hypotetický mechanismus pro spuštění autoimunitních chorob (Yuki, 1997). Termín molekulární mimikry představuje strukturální podobnost nebo identitu mezi patogenními proteiny mikroorganismů a proteiny těla vlastní, další variantou je, že B či T receptory rozpoznají nehomologní peptid, což může vyvolat autoimunitní reakci, která způsobí poškození periferních nervů (Yu et al., 2006; Ang et al., 1999).

Protilátky proti gangliosidům jsou často úzce spojovány s klinickými projevy a konkrétními symptomy. Tato asociace je pravděpodobně závislá na různém uspořádání antigenů gangliosidů v periferní nervové soustavě (Ogawa et al., 2009; Kusunoki et al., 2008). Patogenní působení protilátek proti gangliosidům není vyvíjeno v celém periferním nervovém systému. Nervové poškození, které je způsobeno protilátkami proti gangliosidům, je započato vazbou protilátky na specifické místo periferních nervů a je v podstatě řízeno specifičností protilátky a konkrétním uspořádáním cílových gangliosidů (Kaida & Kusunoki, 2010; Willison & Yuki 2002).

Nejčastěji se vyskytujícími protilátkami rozpoznávající gangliosidy, které mají vztah s poškozením nervů jsou GM1, asialo-GM1 (GA1), GD1a, GD1b a GQ1b (internet 6). Protilátky proti gangliosidům se mohou využít jako diagnostické znaky. (Kusunoki et al., 2008). Účinek těchto anti-gangliosidových protilátek souvisí s konkrétními infekcemi a různými klinickými projevy GBS (Willison & Yuki, 2002; Willison, 2005). Přehled protilátek ve spojení s neuropatiemi je znázorněn v „Tab.1“.

Dosud není jasné, zda mohou protilátky proti gangliosidům započít proces, jehož následkem je neuropatie a jsou tedy hlavními příčinami primárního

imunopatologického poškození, a nebo jsou pouze doplňujícím jevem jiné choroby vedoucí k poškození periferních nervů (Malíčková et al., 2007; Willison & Yuki, 2002).

Tabulka 1: Přehled protilátek proti gangliosidům v souvislosti s výskytem periferních neuropatií

Protilátka	Ig izotyp	Klinická neuropatie	Syndrom
GA1	IgG/IgM	Motorická i senzomotorická neuropatie	GBS/ amyotrofická laterální skleróza (ALS)
GM1	IgG	Akutní motorická axonální neuropatie (AMAN), akutní senzitivně motorická axonální neuropatie (AMSAN)	GBS/ALS
	IgM	Multifokální motorická neuropatie (MMN)	
GM2	IgM	Chronická zánětlivá demyelinizační polyneuropatie (CIDP)	GBS
		GBS po infekci <i>Cytomegalovirem</i> (CMV)	
GD1a	IgG	AMAN, AMSAN Akutní neuropatie s bulbární dysfunkcí	GBS
	IgM	CIDP	
GD1b	IgG	GBS s ataxií, AMAN, AMSAN	GBS
	IgM	Senzitivní ataktická neuropatie, CIDP, Multifokální motorická neuropatie	
GQ1b	IgG	Oftalmoplegie	MFS, GBS s oftalmoplegií
	IgM	Senzitivní ataktická neuropatie	

2.1.4 Autoimunitní periferní neuropatie

Periferní neuropatie představuje heterogenní typ onemocnění, který vzniká postižením periferního nervového systému. Toto onemocnění se může lišit místem postižení periferního nervového systému (neurony, kořeny, ganglia, nervy) rozsahem postižení (mononeuropatie a polyneuropatie), typem léze (axonální, demyelinizační, smíšené) i klinickým průběhem (akutní, chronický, remitující, trvale progresivní) (Ehler, 2009).

Vícečetné systémové postižení periferních nervů se označuje jako polyneuropatie, která může vznikat z různých endogenních a exogenních příčin (zánět, nutriční či vitaminová deficience, imunopatogeneze) (Otruba, 2011; internet 3). Hlavními příznaky postižení jsou projevy motorické i senzitivní (Otruba, 2011). Periferní neuropatie jsou častým neurologickým problémem, přičemž jejich výskyt se udává ve 2-8%, kde se incidence zvyšuje s věkem nad 55 let (Ehler, 2012). Nejčastější příčinou periferní neuropatie je v rozvinutých zemích diabetes mellitus, alkoholismus (Otruba, 2011; Ehler, 2012) a dále jsou to neuropatie vyvolané při autoimunitních, dědičných, hormonálních či metabolických chorobách (Otruba, 2011; internet 4). Mezi nejčastější autoimunitní neuropatie se řadí Guillain-Barrého syndrom (Havránek et al., 2008; Ehler et al. 2011).

Imunitně podmíněné polyneuropatie jsou onemocnění, která jsou vyvolána autoimunitní patologickou reakcí proti vlastním periferním nervům. Hlavním cílem tohoto patologického procesu je Schwannova buňka, periferní myelin nebo i axon periferního nervu (Bednařík, 2001; Pletz et al., 2003). Periferní myelin je složen ze tří základních proteinů, kterými jsou P0, P1, P2, jenž tvoří 70% všech proteinů. Konformace proteinu P0 je závislá na jeho vztahu s lipidy. Hlavními glykolipidy schopných vyvolat imunitní reakci jsou GD1a, GD1b, GM1, GM1b, GT1b, GM2, GQ1b a další. GM1 je hlavně zastoupen v membráně motorického axonu, kdežto GQ1b se nachází v oblastech mozečku a okohybných nervů. Glykoprotein ve vztahu s myelinem je glykosylovaný transmembránový protein zvaný MAG, který je lokalizován v Ranvierových zářezech a účastní se interakce axonu s gliemi (Havrdová a kol., 2001).

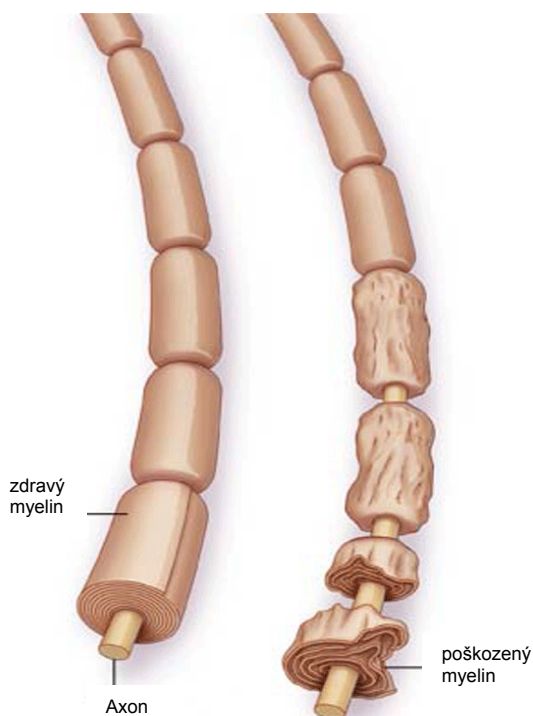
2.1.5 Guillain –Barrého syndrom (GBS)

2.1.5.1 Obecná charakteristika

Guillain-Barrého syndrom je akutní zánětlivá demyelinizující polyneuropatie (AIDP) a je způsoben autoimunitní reakcí působící na periferní nervový systém. Dochází k expresi autoimunitních protilátek a buněk zánětu, které reagují s epitopy na periferních nervech způsobující demyelinizaci (viz „Obr.2“) nebo porušení axonu (Kusunoki et al., 2008; Yu et al., 2006). Tato imunitní odpověď bývá vyvolána předchozí akutní bakteriální (*Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma pneumoniae*) či virovou infekcí (CMV, virus *Ebstein-Barrové*, HIV virus, *Herpes simplex*, *varicella zoster*) i jinými vlivy, kterými mohou být systémové choroby (chronická lymfatická leukémie, systémové autoimunitní choroby, Hodginova choroba), očkování, transplantace kostní dřeně, těhotenství, operace nebo užívání léků (penicilamin) či drog (heroin) (internet 5, Havránek et al., 2008). Asi u dvou třetin postižených osob bývá vyvolána gastrointestinální nebo respirační infekcí (Sejvar et al., 2011; Bulsara et al. 2001) asi 1-3 týdny před rozvojem nemoci (Otruba, 2011; Havránek et al., 2008).

Syndrom Guillainův-Barrého je zánětlivé onemocnění periferních nervů. Periferní nervy předávají senzorické informace, jako je bolest, teplota z těla do mozku a motorické signály z mozku do těla. Jedná se obvykle o těžký průběh onemocnění projevující se vzestupným ochrnutím začínající slabostí v nohou, které se šíří do horních končetin a obličeje spolu s úplnou ztrátou hlubokých šlachových reflexů (Pithadia & Kakadia, 2010).

Jeho vztah k infekci a fakt, že se jedná o autoimunitní onemocnění, dalo v průběhu několika let podnět ke spoustě výzkumům, které vedly k objevu anti-gangliosidových protilátek nejméně u jedné třetiny pacientů s GBS (Pithadia & Kakadia, 2010).



Obrázek 2: Poškození myelinu u pacientů s Guillain-Barrého syndromem, upraveno a převzato z internet 14.

2.1.5.2 Podtypy GBS

Podle typů poškození se GBS dělí na demyelinizační (akutní zánětlivé demyelinizační polyradikuloneuritida- AIDP) a axonální formu (akutní motorická nebo motoricko-senzitivní axonální neuropatie- AMAN, AMSAN) (Bednařík, 2001). Od roku 1995 se GBS rozčleňuje do čtyř hlavních podtypů (Havránek et al., 2008):

Akutní zánětlivá demyelinizující polyradikuloneuropatie (AIDP). Jedná se o fokální segmentální demyelinizující degradaci periferních nervů ve spojení s infiltrací buněk zánětlivého procesu (lymfocyty, makrofágy) (internet 4; Havránek et al., 2008). Imunitní odpověď je zaměřena na Schwanovy buňky a myelinové pochvy a jejím působením dochází k demyelinizaci, která je pro AIDP typická (Pithadia & Kakadia, 2010). Příčinou poškození myelinu jsou především T lymfocyty. U tohoto typu onemocnění se typicky objevuje přítomnost anti-GM1 protilátek. Jedná se o nejvíce se vyskytující formu GBS (Havránek et al., 2008; Ehler et al., 2011) a zároveň je jednou z nejčastějších příčin nervové slabosti na světě (Ehler et al., 2011). Progrese AIDP se nejvíce projevuje v hlavových a sensorických nervech (Otruba, 2011).

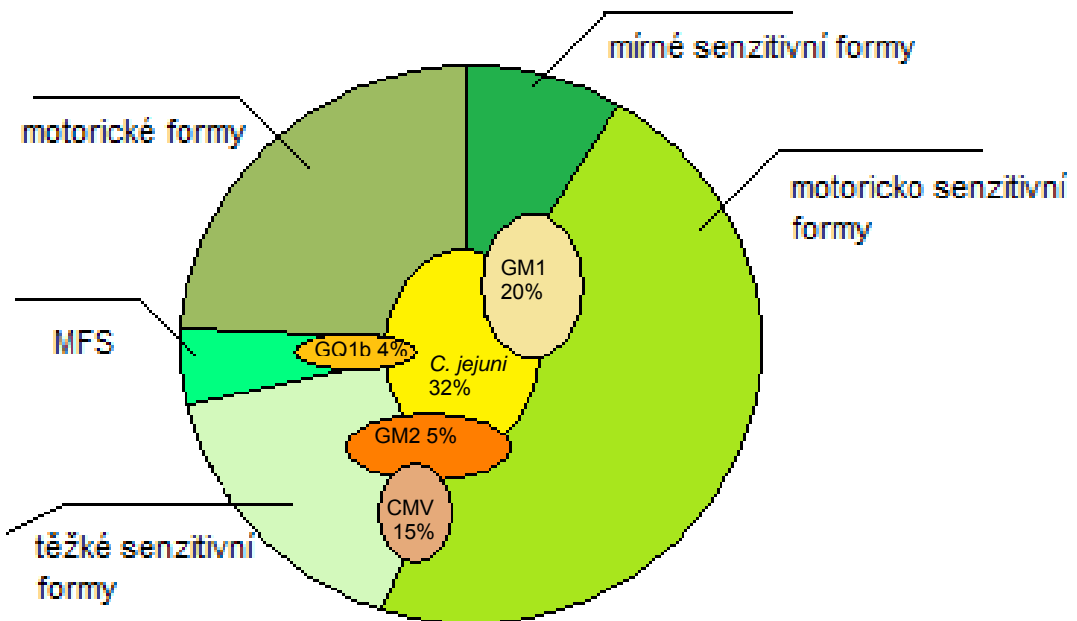
Akutní motorická axonální neuropatie (AMAN). Tento typ je charakteristický axonální degradací motorických nervů a infiltrací lymfocytů (Hafer-Macko et al., 1996; Griffin et al., 1996). Specifické protilátky se váží na membránu axonů a tím aktivují komplement, čímž následuje včlenění makrofágů do periaxonálního prostoru. Ve výsledku dojde k poškození motorických axonů (Havránek et al., 2008). U AMAN dochází poměrně často k selhání dýchání a vyskytuje se již v prvním týdnu onemocnění (Havránek et al., 2008).

Infekce *C.jejuni* způsobující bakteriální gastroenteritidu je hlavní příčinou AMAN. U pacientů s AMAN jsou detekovány hlavně protilátky proti gangliosidům GM1, GM1b, GD1a a GalNAc-GD1a (Koga et al., 2005; Moran et al., 2005).

Akutní motorická a sensorická axonální neuropatie (AMSAN). Tato forma se projevuje po infekci *C. jejuni*, vykazuje podobné příznaky jako AMAN a navíc má postižené sensorické nervy (McKhann et al., 1993; Feasby et al., 1986). Jedná se o nejvzácnější typ GBS s obvykle těžkým průběhem a nejistou prognózou (Havránek et al., 2008). Jeho typickými gangliosidy jsou GM1, GM1b a GD1a (Willison & Yuki, 2002; Yuki et al., 1999).

Miller Fisherův syndrom (MFS). Jde o druhý nejvzácnější typ GBS (Havránek et al., 2008). Postihuje okohybné nervy. Prakticky vždy se u tohoto onemocnění vyskytují pozitivní protilátky proti gangliosidům, GQ1b a GT1a (Yuki, 1997; Ogawa et al., 2009).

Na „Obr.3“ je zobrazen diagram znázorňující vztah mezi infekcí, protilátkami a podtypy GBS.



Obrázek 3: Vztah mezi protilátkami, infekcí a podtypy GBS, převzato a upraveno dle Bednařík, 2001.

2.1.5.3 Projevy GBS

GBS se začíná projevovat v období 2-4 týdnů po akutním onemocnění nebo imunizaci a pak nastává stabilní období trvající asi 2-4 týdny (Bednařík, 2001; Havránek et al., 2008). GBS se vyznačuje progresivní svalovou slabostí, poruchou rovnováhy, parastéziemi a araflexií, běžné jsou i senzorké autonomní a kmenové léze (Bednařík, 2001; Havránek et al., 2008). Hlavním projevem je slabá paréza s hyporeflexií, která začíná hlavně na dolních končetinách a postupuje na trup, horní končetiny a může dojít i k ochabnutí okohybných svalů (Bednařík, 2001; Ehler et al., 2011). Tento typický průběh je nazýván Landryho ascendentní paralýza (Bednařík, 2001; Havránek et al., 2008). Často bývá nemoc spojena s bolestí svalů, páteře nebo neuropatickou bolestí (Ehler et al., 2011). Vzestup nemoci přichází v hodinách, dnech i týdnech. Poruchy hybnosti (parézy) jsou obvykle symetrické. U závažných případů dochází k respiračnímu selhání v důsledku paralýzy (obrní) dýchacích svalů (Havránek et al., 2008).

Porucha koordinace pohybu bývá často spojována s Miller Fisherovým syndromem. Hlavními klinickými charakteristikami jsou: ztráta neurologických reflexů, ataxie a problémy s kontrolou pohybu i čítí (Bednařík, 2001).

Významnými komplikacemi vyskytující se u pacientů trpících GBS mohou být pneumonie, sepse, gastritida nebo plicní embolie (Havránek et al., 2008).

2.1.5.4 Diagnostika GBS

Diagnóza musí být stanovena rychle a přesně. Diagnostika GBS je založena na typickém klinickém nálezů, laboratorním vyšetření mozkomíšního moku odebraného lumbální punkcí, elektromyografií a v některých případech vyšetření magnetickou rezonancí (MRI- magnetic resonance imaging) (Bednařík, 2001; Ehler et al., 2011). Dále se prokazuje pozitivita protilátek proti gangliosidům, především GM1 a GD1 jsou typické pro axonální degeneraci. Průkaz positivity anti-GM1 protilátek obvykle znamená horší prognózu onemocnění (Havránek et al., 2008). Pozitivita anti-GQ1b protilátek bývá především u pacientů s Miller Fisherovým syndromem (internet 4; Willison & Yuki; 2002).

Úroveň postižení se rozděluje do 7 základních stupňů (Havránek et al., 2008; internet 5):

1. normální
2. malé projevy, schopen běhu
3. schopen chůze více jak 5 m bez pomoci
4. schopen chůze méně jak 5 m s pomocí
5. neschopen chůze, schopen zvednout nohy
6. neschopen chůze, neschopen zvednout nohy
7. asistovaná ventilace

Pro správné stanovení diagnózy je nutné, co nejdříve provést elektrofyziologické vyšetření. Samotné stanovení diagnózy není v počátcích nemoci snadné (Ehler et al., 2011). Elektrodiagnostické nálezy jsou velmi důležité pro zjištění typu GBS (demyelinizační nebo axonální). Až v 70% případů se v prvních 2 týdnech prokáže demyelinizační typ léze. (internet 5). Typický je také likvorový nález, kdy se zjišťuje diagnóza demyelinizace při nálezů proteinocytologické disociace s množstvím bílkoviny nad 1 g/l bez průkazu aktivní infekce. V praxi je důležité přemýšlet nad možnou diagnózou GBS, i když jsou výsledky z likvoru negativní, protože prvních 48 hodin od začátku typické symptomatologie nemusí být likvor pozitivní. (internet 5; Havránek et al., 2008) V některých případech jsou nutné i opakované lumbální punkce. Lehce zvýšená přítomnost leukocytů v moku není vzácná, ale více jak 50 leukocytů na mililitr již zpochybňuje diagnózu GBS (Havránek et al., 2008).

2.1.5.5 Patofyziologie GBS

Hlavním impulzem vývoje GBS je infekce respiračního nebo trávicího traktu, což vyvolá neadekvátní imunitní odpověď, která následně vede ke zhroucení

hemoencefalické bariéry a destrukci myelinových pochev i axonů. Kromě bakteriální a virové infekce mohou být původcem tohoto onemocnění různá očkování nebo jiný zásah do lidského organismu jako je například i chirurgický zákrok (Lehmann et al., 2009).

Gram-negativní bakterie *Campylobacter jejuni* je nejčastější příčinou akutní gastroenteritidy a infekce, která může vyvolat imunitní odpověď s možností rozvoje Guillain-Barrého syndromu (Kuijf et al. 2007; Ang, 2004). Imunitní odpověď závisí na bakteriálních faktorech jako je například specifita lipo-oligosacharidů (LOS) a faktory působící na pacienta. LOS jsou jednou z nejdůležitějších struktur buněčného povrchu exprimovaný *Campylobacter jejuni* (Yuki, 2005). Molekulární mimikry mezi lipo-oligosacharidy *Campylobacter jejuni* a gangliosidy periferního nervstva hraje důležitou roli v patogenezi GBS (Steiner et al., 2010; Kuijf et al. 2007). LOS *Campylobacter jejuni* obsahují gangliosid-like úseky, které určují specifitu protilátek proti gangliosidům (van Doorn et al., 2008; Ang, 2004). Gangliosidům se značně podobají lipo-oligosacharidy (LOS) velkého počtu mikrobů (Malíčková et al., 2007). Protilátky proti LOS mohou být zkříženě reaktivní, kdy mohou působit jak na určitý nervový gangliosid, tak mohou aktivovat komplement. Poškození nervu vede k oslabení a může způsobit narušení smyslů (van Doorn et al., 2008).

Předpokládá se, že nemoc je způsobena abnormální T-buněčnou odpovědí v souvislosti s infekcí, která předtím proběhla (Havránek et al., 2008). Vrozená imunitní reakce zajistí vychytávání patogenů nezralými antigen prezentujícími buňkami (APC). Po migraci do lymfatických uzlin mohou zralé diferencované APC buňky prezentovat peptidy v molekulách MHC třídy II a aktivovat CD4+ T buňky, které rozpoznávají patogenní antigeny. B buňky mohou být také aktivovány nově aktivovanými Th2 a dochází k produkci buněk zprostředkovávající humorální odpověď proti patogenu (Pithadia & Kakadia, 2010). Patofyziologie GBS a faktory, které jej ovlivňují jsou znázorněny na „Obr.4“.

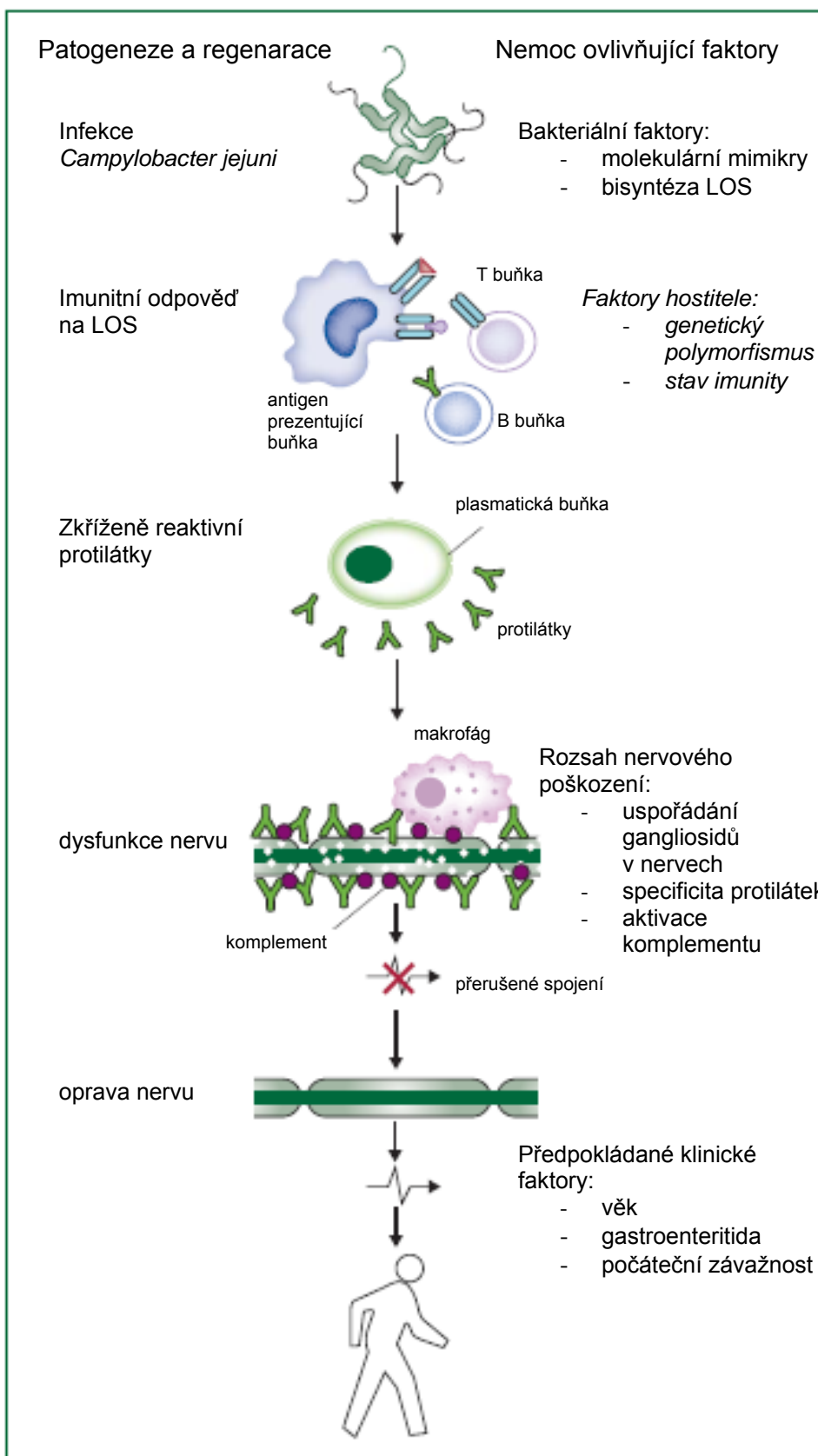
Svoji roli hrají i endogenní antigeny jako myelin P-2 nebo gangliosidy GQ1b, GM1, GD1 a GT1a. Poškození periferních nervů u tohoto onemocnění je způsobeno dvěma procesy a to buď demyelinizací nebo axonální degradací (Havránek et al., 2008).

Periferní nervový systém představuje síť nervových tkání kromě centrálního nervového systému, který zahrnuje mozek a míchu. Periferní nervy jsou chráněny hemoencefalickou bariérou, která brání normální infiltraci makromolekul kromě lymfocytů, které mají umožněný pohyb dovnitř a ven z periferní nervové tkáně (Hughes et al., 1999; Pithadia & Kakadia, 2010). To umožňuje imunitní ochranu ve formě makrofágů a endotelových buněk, které se nacházejí v tkáni. V případě GBS, což je

zánětlivé onemocnění, jsou autoprotilátky schopny projít přes hemoencefalickou bariéru i v normálním stavu. Krevní bariéra nervu je tvořena endoteliálními buňkami v těsných spojeních, které mohou být upravovány zánětlivými stavy, což umožní průchod efektorových buněk a makromolekul (Asbury et al., 1969; Pithadia & Kakadia, 2010). Pokud protilátky překonají bariéru a naváží se na gangliosidy nervové tkáně, mohou způsobit aktivaci komplementu a makrofágů prostřednictvím FcIII receptorů, včetně produkce cytokinů a tvorby zánětu (Hughes et al., 2006; Pithadia & Kakadia, 2010). Tvorbou zánětu myelinu a produkcí cytokinů dochází k aktivaci leukocytů a poškození nervové tkáně. Porušení nervu je způsobeno jedním ze čtyř mechanismů a to lyzí prostřednictvím CD8+ T lymfocytů, destruktivním působením komplementu, cytokinů, volných radikálů a protilátek, které narušují nervový přenos. Hlavním cílem takového útoku imunity jsou gangliosidy, které tvoří komplex s glykosfingolipidy vyskytující se ve velkém množství v lidské nervové tkáni, především v Ranvierových zářezech. Příkladem může být GM1 gangliosid, který může být napadený ve 20-50% případů, hlavně u těch osob, jenž byly před tím infikovány *Campylobacter jejuni* (Koga et al., 2006; Pithadia & Kakadia, 2010).

Současné studie naznačují, že se i iontové kanály zapojují do patofyziologie GBS. Nejúčinnějšími molekulami jsou iontové kanály spojené s obnovou svalového akčního potenciálu jako jsou napětím řízené draselné kanály. Dysfunkcí tohoto iontového kanálu, který je v hojném množství lokalizován v axonálních membránách Ranvierových zářezů, může hrát významnou roli ve vývoji svalové slabosti v případě GBS (Kaida & Kusunoki, 2010).

Nedávno byla prokázána schopnost protilátek proti gangliosidům vyvolat nevhodnou aktivaci komplementové kaskády, která může vést k poranění nervu u GBS. Zejména aktivace komplementu klasickou cestou je považována za klíčový proces, který vede k vývoji GBS a Miller Fisherova syndromu (MFS) (Kaida & Kusunoki, 2010).



Obrázek 4: Patofyziologie GBS a faktory mající vliv na onemocnění (upraveno a převzato dle van Doorn et al., 2008)

2.1.5.6 Léčba GBS

U osob s GBS je nutné kontrolovat tělesnou teplotu, krevní tlak, dechovou frekvenci, respirační funkce a diurézu. Hlavním léčebným postupem je imunosupresivní terapie. Imunosupresiva potlačují nespecificky aktivitu lymfocytů a působí protizánětlivě (Hořejší & Bartůňková, 2009; internet 1).

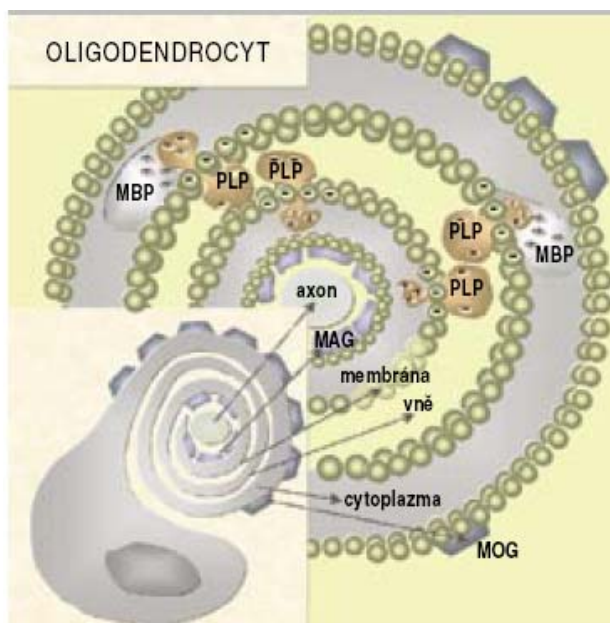
V léčbě má také velmi důležité postavení symptomatická terapie se zaměřením na bolest (internet 4; Ehler, 2012), psychické poruchy, poruchy spánku a další. Pro rekonvalescenci je nezbytná i rehabilitace (Bednařík, 2001).

2.1.5.7 Epidemiologie

GBS je nejčastější akutní autoimunitní získanou periferní neuropatií na světě, avšak přesný odhad incidence není v mnoha zemích znám (Sejvar et al., 2011; internet 5). Incidence osob trpících GBS v Evropě se pohybuje v rozmezí 1,2-1,9 případů na 100 000 osob, zatímco ve světě to je 0,6-4 postižených na 100 000 osob (Pithadia & Kakadia, 2010, Langmuir et al., 1984). Incidence GBS u dětí je v USA udávána asi 0,5-1,5 na 100 tisíc dětí do věku 18 let. Úmrtnost je udávána < 5% a vyskytuje se nejčastěji v souvislosti s nedidiagnostikovanými případy. Úmrtnost u dětí je značně nižší než u dospělých. Díky časně diagnóze a možnosti umělé plicní ventilace v současnosti nenastává smrt nejčastěji v důsledku respiračního selhání, ale v souvislosti se srdeční arytmií nebo dysautomií. (Havránek et al., 2008) Úmrtnost u dospělých se pohybuje kolem 5-10%. (Bednařík, 2001). Výskyt jednotlivých variant GBS je geograficky odlišný. V Kanadě, USA a v Evropě je nejčastěji se vyskytující formou AIDP, v severní Číně jsou to axonální formy AMAN a v Japonsku Miller Fisherův syndrom (Bednařík, 2001; Havránek et al., 2008). V Evropě a Severní Americe stoupá výskyt GBS úměrně s rostoucím věkem (Steiner et al., 2010; Govoni & Granieri, 2001).

2.2 MAG (myelin asociovaný glykoprotein)

Myelin asociovaný glykoprotein (MAG) je transmembránový glykoprotein umístěný v periaxonálních Schwanových buňkách a oligodendroglálních membránách myelinových pochev (viz „Obr.5“), kde se účastní interakcí mezi axony a gliemi jak v periferní tak centrální nervové soustavě (Quarles, 2002; Matá et al. 2011). Je velmi důležitý pro tvorbu a zachování myelinu, přesto je také znám jako inhibitor regenerace axonů a jako antigen pro IgM monoklonální protilátky, které způsobují demyelinizující periferní neuropatie (Quarles, 2007; Malíčková et al., 2007). Prozatím ale není jasné, jak souvisí schopnost tohoto glykoproteinu inhibovat růst axonů a jeho funkce v periaxonální gliální membráně myelinizovaných axonů (Quarles, 2009).



Obrázek 5: Lokalizace MAG, převzato z Krejsek et al., 2002.

2.2.1 Struktura MAG

Jedná se o 100kDa glykoprotein skládající se z karbohydrátového epitopu HNK-1 a pěti imunoglobulin-like domén, přičemž jedna je transmembránová, jedna cytoplazmatická a pět extracelulárních (Spagnol et al., 1998; Quarles, 1997). Řadí se mezi nervové sialoadheziny, jež jsou strukturně a funkčně podobné skupině pěti imunoglobulinů ze superrodiny lektinů tzv. lektiny I-typu. Každý lektin I-typu váže karbohydrátovou strukturu nesoucí na svém konci neredukující sialovou kyselinu, která má jedinečnou rozpoznávací funkci (Collins et al. 1997; Spagnol et al., 1998). MAG se projevuje jako ligand pro axonální receptor, který je nutný pro myelinizaci axonů a jako receptor při přenosu signálu mezi axony, který podporuje diferenciaci, ochranu a přežití oligodendrocytů (Yin X. et al., 1998; Quarles, 2007). MAG je exprimován ve dvou izoformách s odlišnými cytoplazmatickými doménami, které mohou aktivovat různé signální cesty při utváření myelinu na buňkách. MAG je minoritní součástí myelinu, účastní se interakce mezi axony a Schwanovými buňkami (Kawagashira et al., 2010).

2.2.2 Funkce MAG

Funkce axonu je řízena podpůrnými buňkami zvané glie, kterými jsou oligodendrocyty v centrální nervové soustavě a Schwannovy buňky v periferní nervové soustavě. Tyto elementy obalují axon myelinem, který představuje izolační strukturu mnohvrstevné membrány (Nave & Trapp, 2008; Poliak & Peles, 2003). Myelin umožňuje rychlý nervový přenos díky tomu, že poskytuje segmentální izolaci, kontroluje strukturu a umístění iontových kanálů v Ranvieriho zářezech a také řídí cytoskelet axonu. Myelin mimo jiné vyživuje axon, demyelinizace tedy vede k degeneraci axonu (Poliak & Peles, 2003). Vzájemné interakce mezi axonem a myelinem jsou řízené myelin asociovaným glykoproteinem (Nave & Trapp, 2008; Edgar & Garben, 2004).

V posledních letech bylo zjištěno, že MAG chrání axony před akutní toxicitou vyvolanou různými axonopatickými látkami, včetně průmyslového neurotoxinu akrylamidu nebo chemoterapeutického vinkristinu a zánětlivých mediátorů. Tyto údaje prokazují, že MAG jako jedna z molekul myelinu je zodpovědný za stabilizaci a ochranu axonu. Na druhou stranu MAG inhibuje regeneraci axonu při poškození CNS, tudíž brání obnově funkce axonu (Nguyen et al. 2009; Lopez et al., 2011). Působení myelin asociovaného proteinu je zprostředkováno vazbou na jeden nebo více receptorů axonu. Funkční MAG receptory na axonech zahrnují hlavní mozkové gangliosidy GD1a a GT1b, β 1-integrin a glykosylfosfatidylinositol (Yiu & He, 2006; Schnaar & Lopez, 2009). Ačkoli není známá role všech receptorů MAG, zdá se, že MAG zapojuje své receptory do procesu inhibice axonálního růstu (Vinson et al., 2003; Mehta et al. 2007).

Dále se ukazuje, že se MAG účastní přenosu signálu v obou směrech mezi axony a gliemi. Dlouho se předpokládalo, že MAG je gliovým receptorem pro axonální signál, který vede k myelinizaci. Avšak některé studie potvrdily jeho roli především v CNS, kde MAG zastává funkci ligandu, který se váže na receptor na povrchu axonu. Těmito funkcemi se MAG zapojuje do signálních drah, které se účastní formování myelinu na oligodendrocytech nebo Schwannových buňkách na jedné straně a v axoplasmě myelinových axonů na straně druhé (Quarles, 2007).

2.2.3 Patologie MAG

MAG je známým autoantigenem monoklonálních imunoglobulinů ve třídě IgM, které souvisejí s neurologickými poruchami způsobené autoimunitními mechanismy. Nejznámějším příkladem je chronická sensorimotorická demyelinizační periferní neuropatie, u které se nejprve projevují příznaky poškození senzitivních a až posléze motorických nervů (Quarles, 2007; Matá et al. 2011;). Chronická sensorimotorická

demyelinizační periferní neuropatie se vyskytuje asi u poloviny pacientů ve spojení s monoklonální gamapatií IgM, jenž se prokazuje pozitivním nálezem protilátek proti MAG (Spagnol et al., 1998). Množství anti-MAG protilátek u pacientů s chronickou demyelinizační periferní neuropatií nejspíše způsobuje proces demyelinizace a dochází k poškození interakce mezi axonem a příslušnou Schwannovou buňkou (Quarles, 1997). Z tohoto důvodu je detekce anti-MAG autoprotiátek užitečná pro stanovení aktivity demyelinizace periferních nervů u pacientů trpících monoklonální gamapatií.

2.2.4 Monoklonální gamapatie

2.2.4.1 Obecná charakteristika

Monoklonální gamapatie představuje různorodou skupinu onemocnění, která se vyznačuje maligní nebo potenciálně maligní proliferací plazmatických buněk, což jsou konečná stadia transformovaných B lymfocytů (Ramchandren & Lewis, 2012; Ščudla et al., 2010). Produktem plazmatických buněk je monoklonální protein (paraprotein) (Kovářová & Hájek, 2011) nebo jeho strukturální komponenty, kterými jsou lehké vzácně i těžké řetězce imunoglobulinů (Ščudla et al., 2010). Monoklonální imunoglobuliny mohou mít benigní povahu, která ovšem nemusí být trvalá a může docházet ke změnám vedoucím k malignitě (internet 7). Nejčastějším paraproteinem vyskytující se u demyelinizujících neuropatií je IgM paraprotein, který reaguje s myelin asociovaným glykoproteinem (MAG) (Lehmann et al., 2009).

Monoklonální gamapatie zahrnuje více onemocnění počínaje monoklonální gamapatií nejasného významu zkráceně MGUS (Sandecká et al., 2009) a konče maligními systémovými onemocněními, jako jsou mnohočetný myelom, amyloidóza, Waldenströмова makroglobulinémie nebo POEMS syndrom, představující polyneuropatii, organomegalii, endokrinopatii, monoklonální gamapatii a kožní změny (Ramchandren & Lewis, 2012).

Monoklonální gamapatie nejasného významu představuje prekancerózní stav bez klinických příznaků vyznačující se B buněčnou proliferací s nadprodukcí monoklonální protilátky (paraprotein) (Stubbs et al., 2003; IMWIG, 2003). Tento název je tedy určen podle přítomnosti monoklonálního proteinu, jenž je detekovatelný v séru či moči pacienta a zároveň nejsou splněna kritéria diagnostikující mnohočetný myelom (MM), Waldenströmovu makroglobulinémii, AL-amyloidózu nebo jiná lymfoproliferativní zhoubná onemocnění (Ščudla & Pika, 2009).

MGUS je benigní choroba, která se však může vyvinout v maligní mnohočetný myelom nebo jiná lymfoproliferativní onemocnění (Rajkumar, 2009; Rajkumar et al. 2004). MGUS je nejčastěji se vyskytující monoklonální gamapatie (Ariga, 2011; Lacy et al., 1999). Velkou roli v patogenních změnách tohoto onemocnění hrají viry, cytokiny,

onkogeny a angiogeneze kostní dřeně, avšak dosud není přesně znám mechanismus, který má za následek vývoj v nádorové onemocnění, kterým je nejčastěji MM (Azhar et al., 2002; Rajkumar et al., 2002). MGUS je nejčastější hematologické onemocnění vyskytující se ve spojení s neuropatií (Živkovič et al., 2009).

Vznik a vývoj monoklonální gamapatie není v současnosti možné předvídat, a proto se stále hledají nové prediktivní i prognostické markery, které by mohly pomoci nalézt rizikové skupiny pacientů, zabránit transformaci do maligního onemocnění a v případě prognostických markerů umožnit specifitější a včasnou léčbu pacientů s již maligním mnohočetným myelomem (Kovářová & Hájek, 2011).

2.2.4.2 Diagnostika monoklonální gamapatie

K hlavním vyšetřením monoklonální gamapatie se řadí stanovení přítomnosti paraproteinu v séru či v moči. Tento způsob diagnostiky je rutinně prováděn elektroforézou a imunofixací, nově je zaváděno stanovení volných lehkých řetězců v séru. Stanovení volných lehkých řetězců je v současnosti součástí kritérií pro stanovení monoklonální gamapatie nejasného významu. Dalším zásadním vyšetřením je stanovení rozsahu postižení kostní dřeně pomocí cytologického a histologického vyšetření, nově i pomocí imunofenotypizace respektive imunohistochemie za cílem potvrdit přítomnost nádorových plazmatických buněk. Dále je průkaz postižení kostí proveden pomocí CT nebo MRI (Maisnar & Hájek, 2008).

2.2.4.3 Monoklonální gamapatie nejasného významu asociované s periferní neuropatií

Monoklonální imunoglobulin se ve většině případů neváže na antigeny lidského těla, ale existují i výjimky. Pouze u malého množství případů je monoklonální imunoglobulin zaměřen proti některým antigenům a pak je jeho výskyt spojen s netypickými patologickými projevy. Nejčastěji je monoklonální imunoglobulin zaměřen na některé antigeny periferních nervů (internet 7). Monoklonální protilátky IgM mohou reagovat s myelin asociovaným glykoproteinem a jsou tak úzce spojovány se specifickým typem lidské periferní demyelinizace. Tento patofyziologický proces je příkladem protilátkami vyvolané demyelinizace u lidí (Tatum, 1993).

Neuropatie ve spojení s monoklonální gamapatií mohou být velmi heterogenní z hlediska klinického průběhu, elektrofyziologie i odpovědi na léčbu (Lehmann et al., 2009).

2.2.4.3.1 Klinické projevy

Anti-MAG paraproteinová neuropatie je klinicky charakterizována převážně jako senzorická demyelinizační neuropatie. Celková prognóza tohoto onemocnění je lepší než u jiných chronických imunitou vyvolaných neuropatií (Lehmann et al., 2009).

Neuropatie je způsobena autoreaktivitou monoklonálních protilátek ve třídě IgM (internet 8). Neuropatie ve spojení s monoklonální gamapatií je demyelinizační proces, pro který jsou typické senzorické a motorické příznaky se zálným nástupem a pomalým vývojem (Gabriel et al., 1996; internet 8). Demyelinizace periferních nervů může být zapříčiněna různými imunitními mechanismy, které zahrnují B a T lymfocyty, makrofágy, protilátky působící proti nervům nebo cytokiny (Latov & Renaud, 2004). Polyneuropatie ve vztahu s monoklonální gamapatií se projevuje různými klinickými, elektrodiagnostickými a patologickými znaky (Kaku et al., 1994). Počáteční příznaky neuropatie se mohou vyskytovat ve formě senzitivních problémů v distální části dolních končetin (Kaku et al., 1994; Havrdová a kol., 2001). Rozložení motorických poruch je typické tím, že jsou primárně postiženy svaly chodidel a nohou, mnohem méně jsou postiženy ruce a předloktí. Atrofie postižených svalů se vyvíjí pomalu během několika měsíců a její intenzita je úměrná počtu poškozených nervových vláken (Nemni et al., 1994).

Klinická diagnóza je založena na motorickém úbytku s amyotrofií, omezení nebo ztrátě hlubokých reflexů a snížení povrchové hluboké citlivosti (Nemni et al., 1994).

Typickými znaky paraproteinové demyelinizující neuropatie je vyšší věk, postupná progresa v dolních končetinách, demyelinizace nervového spojení, spíše senzorické postižení než motorické, a ve většině případů postihuje muže (Kawagashira et al., 2010). Dalším klinickým znakem je abnormální umístění myelinu, které může být zachyceno elektronovým mikroskopem (Lehmann et al. 2009).

2.2.4.3.2 Léčba

Mnoho studií poukazuje u neuropatií na přítomnost patogenní role anti-MAG protilátek ve třídě IgM (Nobile-Orazio et al., 2000; Gorson et al., 2001). Vysoké hladiny protilátek ve třídě IgM proti MAG jsou spojovány s chronickou, pomalu postupující symetrickou hlavně senzorickou demyelinizační neuropatií (Gorson et al., 2001). Tato skutečnost podporuje u pacientů užití imunomodulační léčby (Nobile-Orazio et al., 2000). Léčba je zaměřena na snížení hladiny paraproteinu ve třídě IgM a protilátek proti MAG (Gorson et al., 2001). Například v případě pacientů trpících syndromem POEMS je léčebnou strategií nasazení chemoterapeutik ve vysokých dávkách a transplantace kmenových krvetvorných buněk, což může vést ke snížení

hematologických projevů a výraznému neurologickému zlepšení (Lehmann et al., 2009).

Někteří pacienti neprokazují vztah mezi paraproteinem IgM a protilátkami proti MAG a nedochází ani k odpovědi na léčbu (Gorson et al., 2001). Tento typ neuropatie se zatím jeví být rezistentní vůči standardní imunomodulační terapii (Aldea, 2012).

Prozatím není objasněno, proč závažnost neuropatie neodpovídá množství protilátek v séru a proč pacienti s vysokými hladinami anti-MAG protilátek prokazují neuropatii, která nelze klinicky potvrdit nebo neuropatií vůbec netrpí (Spagnol et al., 1998).

2.2.4.3.3 Patofyziologie

Vznik i vývoj periferní neuropatie u pacientů s monoklonální gamapatií není dosud zcela objasněn. (Ramchandren & Lewis, 2012) Paraproteiny zkříženě reagují s nervovými antigeny jako jsou MAG, glykoproteiny nacházející se v myelinové pochvě centrálních i periferních nervů a dalšími glykokonjugáty v nervech nesoucích cukerné epitopy HNK-1 (human natural killer-1) (Gabriel et al., 1996; Nobile-Orazio et al., 2000). Tato interakce vede k aktivaci komplementu a nervovému poškození (Ramchandren & Lewis, 2012; Khadilkar et al., 2011). Uvádí se, že u poloviny pacientů s neuropatií ve spojení s IgM monoklonální gamapatií reaguje paraprotein s myelin asociovaným glykoproteinem (MAG) (Gorson & Ropper, 1997; Nobile-Orazio et al., 2000).

Monoklonální protilátky IgM reagují s cukernými epitopy nacházející se na MAG. Lidský MAG obsahuje cukerný epitop HNK-1, který je nezbytný jako cílový antigen u autoimunitní periferní neuropatie ve spojení s IgM gamapatií (Gabriel et al., 1996; Quarles, 2007). Některé sacharidy na buněčném povrchu prokazují vztah s mezibuněčným rozpoznáváním a jejich adhezí. Sacharidový epitop HNK-1 se účastní rozpoznávání povrchových antigenů na lymfocytech včetně NK buněk (Ariga, 2011). HNK-1 epitop se běžně nachází v periferním a centrálním nervovém systému. Tento epitop se kromě MAG nachází i na dalších proteinech periferního myelinu, kterými jsou protein P0 a periferní myelinizovaný protein 22 (PMP-22) (Lunn et al., 2002; Spagnol et al., 1998).

IgM protilátky na nervových antigenech jsou prokázány u pacientů s monoklonální gamatií ve spojení s neuropatií avšak ne bez neuropatie (Ramchandren & Lewis, 2012). Nicméně u spousty pacientů s monoklonální gamapatií není identifikována aktivita protilátek (internet 8).

2.2.4.3.4 Epidemiologie

Monoklonální gamapatie ve spojení se neuropatiemi, byla poprvé popsána v 60 a 70 letech 20. století u pacientů s mnohočetným myelomem. Monoklonální gamapatií trpí 1% potencioálně zdravích jedinců starších 25 let (Ramchandren & Lewis, 2012). Výskyt monoklonální gamapatie stoupá s věkem (Ariga, 2011; Živkovič et al., 2009). Avšak ve spojitosti s autoimunitními periferními neuropatiemi se incidence monoklonální gamapatie pohybuje kolem 10% (Stubbs et al., 2003; Rossi et al., 2007). Asi jedna třetina těchto pacientů má mnohočetný myelom, osteosklerotický myelom, amyloidózu, lymfom nebo jiné lymfoproliferativní onemocnění a zbytek pacientů trpí monoklonální gamapatií neurčitého významu (MGUS) (Gorson & Ropper, 1997; Ramchandren & Lewis, 2012). Skutečná prevalence MGUS není známa, protože neexistují studie, které by se incidencí tohoto onemocnění blíže zabývaly. (McMaster & Landgren, 2010) MGUS je nejčastější hematologické onemocnění vyskytující se ve spojení s neuropatií (Živkovič et al., 2009). Výskyt MGUS roste s věkem. (Ariga, 2011; Gorson & Ropper, 1997) Tímto onemocněním trpí asi 3 % populace starší 70 let a u osob nad 50 let se čísla incidence pohybují kolem 1 % (Ščudla & Pika, 2009; IMWIG). Více jak u třetiny pacientů s MGUS může dojít k vývoji periferní neuropatie. Periferní neuropatie se vyskytuje u pacientů se systémovou amyloidózou až v 17% případech, u Waldenströmovy makroglobulinemie se incidence periferní neuropatie pohybuje mezi 5-10% (Ramchandren & Lewis, 2012).

3 Experimentální část

3.1 Reagencie

V posledních letech se ve světě rozšířila nabídka diagnostických souprav na stanovení protilátek proti specifickým neuronálním glykokonjugátům. Na trhu se nejčastěji objevují stanovení využívající nepřímé imunofluorescence, blotové techniky či enzymové imunoanalýzy. K zavedení metody do praxe bylo zapotřebí provést průzkum trhu a vybrat vhodnou pracovní soupravu. Na celé tržní sféře existuje pouze několik málo zástupců zabývajících se detekcí autoprotilátek proti glykokonjugátům pomocí enzymové imunoanalýzy. V našem případě jsme se rozhodli vybrat švýcarskou firmu Bülmann laboratories AG, jejichž výrobky jsou opatřeny CE značkou (certifikát shody pro evropský trh). V práci bylo využito následujících souprav :

Souprava GanglioCombi with Enzyme Label Mix IgG/IgM, anti-Ganglioside autoantibodies ELISA

Souprava umožňuje stanovení šest autoprotilátek proti gangliosidům (GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b, GQ1b) ve třídě IgG i IgM v séru. Výhodou ELISA techniky je dosažení kvantitativního výsledku významného pro sledování vývoje onemocnění. Souprava umožňuje stanovit 12 vzorků +kalibrátor a kontroly.

Reagencie:

- koncentrát promývacího pufru (100 ml)
- inkubační pufr (100 ml)
- lyofilizovaný kalibrátor (1 ampule)
- lyofilizované kontroly- negativní, střední a nízká (3 ampule)
- enzymová směs - protilátky proti lidskému IgG a IgM konjugované s křenovou peroxidasou v proteinovém pufru (11 ml)
- substrát obsahující tetramethylbenzidin, peroxid vodíku, dimethylformamid (11 ml)
- zastavovací roztok- 0.25M kyselina sírová (11 ml)
- mikrotitrační destička potažená gangliosidy

Spotřební materiál a pomůcky:

- krycí fólie (3 kusy)
- plastové zkumavky s uzávěrem
- pipetovací špičky
- buničina
- odměrný válec 1000 ml

- skleněná kádinka 2000 ml
- multikanálová pipeta
- automatické pipety 20 µl, 100 µl, 1 ml
- sklěněná pipeta 2 ml

Souprava Anti-MAG anti-Myelin Associated Glycoprotein Autoantibodies ELISA

Diagnostická souprava je určena pro kvantitativní stanovení autoprotilátek IgM proti myelin asociovanému glykoproteinu v séru. Souprava umožňuje stanovení 82 vzorků + kalibrátory, kontroly a blank.

Reagencie:

- koncentrát promývacího pufru (100 ml)
- inkubační pufr (100 ml)
- lyofilizované kalibrátory A-D, ve formě lidských sér (4 ampule)
- kontrolní sérum vysoké a nízké hladiny (2 ampule)
- enzymový marker IgM- protilátka proti lidskému IgM konjugovaná s křenovou peroxidasou v proteinovém pufru (11 ml)
- substrát obsahující tetramethylbenzidin, peroxid vodíku, dimethylformamid (11 ml)
- zastavovací roztok- 0.25M kyselina sírová (11 ml)
- mikrotitrační destička potažená lidským myelin asociovaným glykoproteinem (MAG)

Spotřební materiál a pomůcky:

- krycí fólie (3 kusy)
- pipetovací špičky
- plastové zkumavky s uzávěrem
- buničina
- odměrný válec 1000 ml
- skleněná kádinka 2000 ml
- multikanálová pipeta
- automatické pipety 20 µl, 100 µl, 1 ml
- sklěněná pipeta 2 ml

Přístroje:

Název přístroje a příslušenství	Firma
EVOLIS Premium System- plně automatizovaný mikrotitrační procesor	Bio-Rad
Vortex	UNIEQUIP
Vertikální třepačka	Labsystems

3.2 Biologický materiál

3.2.1 Vzorky pacientů pro stanovení protilátek proti gangliosidům

Prvotním získaným materiálem byla plná krev, která byla po odběru zcentrifugována pro získání krevního séra. Alikvoty pacientů byly do analýzy skladovány při teplotě -20°C . Po analýze nebyly vzorky uchovány z důvodu nestability protilátek, ale bylo s nimi zacházeno jako s biologickým odpadem, který byl následně zneškodněn. Stanovení bylo možné provést po rozmražení pouze jednou, proto bylo s krevními séry pacientů zacházeno jako s jedinečným a vzácným materiálem.

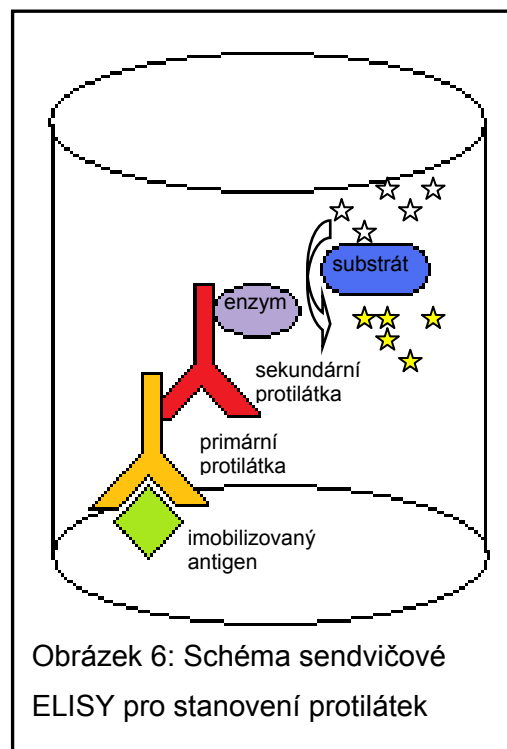
Pro výběr vhodných pacientů bylo nutné prostudovat odbornou literaturu, týkající se neuropatických onemocnění a specifikovat typické příznaky. Na základě těchto znalostí byly zvoleny diagnózy podle kterých byla vybírána patientská séra. Informace o diagnóze pacientů byly získány z laboratorního informačního systému LIS nazývaný OpenLims a z nemocničního informačního systému MEDEA. Vybranými diagnózami byly G629– polyneuropatie a G610– Guillain-Barrého syndrom. Tato diagnostikovaná onemocnění se nevyskytují často, a proto byl sběr pacientů zdlouhavý.

3.2.2 Vzorky pacientů pro stanovení protilátek proti myelin asociovanému glykoproteinu MAG

Výběr pacientů pro stanovení protilátek proti MAG byl založen hlavně na přítomnosti monoklonálního proteinu (paraproteinu) nikoliv na diagnóze, ale ve výsledku měli všichni zvolení pacienti diagnostikovaný MGUS nebo MM. Vzorky pacientů byly nejprve vyšetřeny pomocí elektroforézy sérových bílkovin na přítomnost paraproteinu. Pozitivní vzorky byly otypizovány metodou imunofixace na typ paraproteinu. Z těchto pacientů byli pro analýzu vybráni pacienti s paraproteinem ve třídě IgM. Celkem bylo vybráno 42 osob. Jako negativní skupina byli vybráni pacienti s paraproteinem ve třídě IgG a IgA v celkovém počtu 40 osob.

3.3 ELISA

V práci byla použita metoda ELISA, jejíž název pochází z anglického Enzyme Linked ImunoSorbent Assay. ELISA je nejčastěji používanou imunoanalýzou k detekci protilátek, antigenů a haptenu. Princip tohoto stanovení je založen na specifické interakci antigenu a protilátky, kdy je jedna z těchto komponent označena enzymem. Enzym zajišťuje chemickou přeměnu substrátu, který je do reakce přidán, za vzniku barevného produktu, jenž je spektrofotometricky měřitelný. Tento typ imunoanalýzy využívá přilnutí jednoho imunoreaktantu k pevné fázi, kterou může být jamka mikrotitrační destičky, zkumavka



nebo magnetické částice. Pevná fáze umožňuje separaci vázaných a volných značených imunokomponent (internet 13; internet 12). Metoda ELISA využívá obvykle dvou způsobů upořádání: kompetitivní a nekompetitivní (sendvičová a nepřímá ELISA) (internet 13). Principem našeho stanovení je imunoanalýza sendvičového typu. Obě analýzy jsou velmi citlivé na teplotu, reagentie a rozmražené vzorky se proto musí neustále chladit. Pouze substrát je ponechán při pokojové teplotě.

Schématické znázornění imunochemické reakce je zobrazeno na „Obr. 6“.

3.3.1 Detekce anti-gangliosidových protilátek

Princip metody

Mikrokyvety mikrotitrační destičky jsou potaženy jednotlivými antigeny (GA1, GM1, GM2, GD1a, GD1b, GQ1b). Kontroly, kalibrátory i lidská séra se inkubují s imobilizovanými antigeny za tvorby imunokomplexu. Následným promýváním dojde k odstranění volných komponent. Následuje přidání protilátky proti lidskému IgG a IgM značené křenovou peroxidasou. Obě inkubace probíhají při teplotě 2-8°C. Po opětovném promytí se přidá substrát obsahující tetramethylbenzidin (TMB). Jeho působením dojde k vytvoření modrého zbarvení. Tato reakce indikuje ve vzorku přítomnost protilátek proti gangliosidům specificky se vázajících na antigen. Reakce je zastavena stopovacím roztokem obsahující zředěnou kyselinu sírovou za vývoje barevné změny z modré na žlutou. Intenzita zbarvení je ihned fotometricky změřena při

450 nm na analyzátoru EVOLIS. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci autoprotilátek ve vzorku.

Pracovní postup

Uskladněné alikvoty pacientů viz „Tab 2“ při -20°C je třeba nechat rozmrznout při pokojové teplotě, promíchat je na vortexu a uložit do chladna při teplotě $2-8^{\circ}\text{C}$. Vzorky je třeba před analýzou naředit inkubačním pufrům v poměru 1:50 (30 μl séra + 1470 μl inkubačního pufru) a promíchat na vortexu.

Tabulka 2: Vybraní pacienti pro detekci protilátek proti gangliosidům

Označení vzorku	Pohlaví	Diagnóza	Věk	Materiál
1. sada pacientů				
Pacient 1	Muž	G629	51	sérum
Pacient 2	Žena	G629	85	sérum
Pacient 3	Žena	G629	55	sérum
Pacient 4	Muž	G629	65	sérum
Pacient 5	Muž	G629	85	sérum
Pacient 6	Žena	G629	84	sérum
Pacient 7	Muž	G629	61	sérum
Pacient 8	Žena	G629	58	sérum
Pacient 9	Muž	G629	47	sérum
Pacient 10	Žena	G629	69	sérum
Pacient 11	Žena	G629	63	sérum
Pacient 12	Žena	G629	79	sérum
2.sada pacientů				
Pacient 1	Žena	G629	81	sérum
Pacient 2	Muž	G629	75	sérum
Pacient 3	Muž	G629	78	sérum
Pacient 4	Muž	G629	67	sérum
Pacient 5	Muž	G629	67	sérum
Pacient 6	Muž	G629	56	sérum
Pacient 7	Žena	G629	21	sérum
Pacient 8	Muž	G629	58	sérum
Pacient 9	Žena	G629	48	sérum
Pacient 10	Muž	G629	67	sérum
Pacient 11	Muž	G629	52	sérum
Pacient 12	Žena	G629	91	sérum
3. sada pacientů				
Pacient 1	Žena	G629	58	sérum
Pacient 2	Žena	G629	79	sérum

Pacient 3	Žena	G629	74	sérum
Pacient 4	Žena	G629	66	sérum
Pacient 5	Žena	G629	72	sérum
Pacient 6	Žena	G629	73	sérum
Pacient 7	Muž	G629	72	sérum
Pacient 8	Žena	G629	57	sérum
Pacient 9	Muž	G629	68	sérum
Pacient 10	Žena	G629	44	sérum
Pacient 11	Žena	G629	77	sérum
Pacient 12	Muž	G629	61	sérum
4. sada pacientů				
Pacient 1	Žena	G629	77	sérum
Pacient 2	Muž	G629	107	sérum
Pacient 3	Žena	G629	68	sérum
Pacient 4	Žena	G629	38	sérum
Pacient 5	Žena	G629	52	sérum
Pacient 6	Žena	G629	65	sérum
Pacient 7	Žena	G629	53	sérum
Pacient 8	Žena	G629	68	sérum
Pacient 9	Muž	G629	74	sérum
Pacient 10	Žena	G629	59	sérum
Pacient 11	Muž	G629	65	sérum
Pacient 12	Muž	G610	61	sérum

Příprava reagensí:

- Promývací pufr naředíme 10x, ke 100 ml pufru přidáme 900 ml deionizované vody. Promývací pufr uložíme do chladna, 2-8°C.
- K ampuli lyofilizovaného kalibrátoru přidáme 1,5 ml inkubačního pufru. Kalibrátory necháme rozpouštět po dobu 30 minut při teplotě 2-8°C (z celkového časového intervalu uložíme reagensie na 15 minut na víčko ampule).
- Kontrolní séra v lyofilizované formě (střední, nízká, vysoká hladina) připravíme přidáním 1,5 ml inkubačního pufru a po dobu 30 minut je necháme rozpouštět v chladnu při teplotě 2-8°C (z celkového časového intervalu uložíme reagensie na 15 minut na víčko ampule).

Připravíme si destičku s dostatečným počtem jamek k testování. Nepoužité jamky ihned vrátíme do sáčku se sušidlem.

Kyvety mikrotitrační destičky vymyjeme chlazeným promývacím puřrem 2x 300 μ l. Kyvety je potřeba řádně vysušit a vyklepat. Poté napipetujeme po 100 μ l kalibrátor (Cal) do kyvet A1, A2; střední kontrolu (MED) do B1, B2; nízkou kontrolu (LOW) do A3, A4; a negativní kontrola (NEG) do B3, B4. Jednotlivá nařeřená séra pacientů pipetujeme do kyvet C1-H1, C2-H2 apod. Po šesti napipetovaných vzorcích je potřeba na chvíli destičku vychladit při teplotě 2-8°C.

Po napipetování všech substancí přikryjeme mikrotitrační destičku krycí fólií a necháme destičku inkubovat 2 hodiny při teplotě 2-8°C. Poté odstraníme fólii, vyprázdníme kyvety a promyjeme destičku chlazeným promývacím puřrem 3x 300 μ l. V dalším kroku přidáme 100 μ l enzymového Mix (IgG/ IgM) do příslušných kyvet. Destičku opět přikryjeme fólií a ponecháme ji inkubovat 2 hodiny při teplotě 2-8°C. Po uplynutí inkubační doby odstraníme fólii, vyprázdníme kyvety a promyjeme je chlazeným promývacím puřrem 3x 300 μ l. Následně přidáme 100 μ l substrátu TMB vytemperovaného na 18-28°C. Opět přikryjeme destičku fólií a umístíme ji na vertikální třepačku nastavenou na 400-600 rpm po dobu 30 minut při teplotě 18-28°C. Je třeba chránit destičku před přímým světlem. V poslední fázi přidáme 100 μ l stopovacího roztoku. Tento krok je potřeba uřeřit do 30 minut. Pokud dojde ke vzniku vzduchových bublin, odstraníme je špičkou pipety. Do 30 minut změříme fotometricky absorbanci při 450 nm na přístroji EVOLIS.

3.3.2 Detekce anti-MAG protilátek

Princip metody

Kyvety mikrotitrační destičky jsou potaženy vysoce purifikovaným lidským MAG antigenem. Během inkubace se anti-MAG protilátky naváží na imobilizovaný lidský MAG. Následným promytím se odstraní všechny nenavázané jednotky a přidají se protilátky proti lidskému IgM značené křenovou peroxidasou. Po opětovné inkubaci a promytí se přidá substrát obsahující tetramethylbenzidin. Navázáním autoprotilátek dojde k modrému zbarvení. Reakce je zastavena stop roztokem obsahující zřeřenou kyselinu sírovou za vývoje barevné změny z modré na žlutou. Absorbance je fotometricky změřena při 450 nm na analyzátoru EVOLIS. Hodnota absorbance je přímo úměrná koncentraci autoprotilátek ve vzorku. Kalibrátory uřité v testu slouží k sestrojení kalibrační křivky, která je nutná k vypořtu koncentrace autoprotilátek proti MAG ve vzorku.

Pracovní postup

Vzorky pacientů viz „Tab. 3“ je třeba nechat zcela rozmrznout při pokojové teplotě po dobu 10-15 minut za občasného promíchání na vortexu. Poté se rozmrřlé

vzorky uloží opět do chladna při teplotě 2-8°C. Vzorky je třeba naředit inkubačním pufrem v poměru 1:1000 (1 µl séra + 1 ml inkubačního pufru). Naředěné vzorky se ponechají 1 hodinu stát při teplotě 18-28°C s občasným promícháním na vortexu.

Tabulka 3: Vybraní pacienti pro detekci anti-MAG protilátek

Označení vzorku	Pohlaví	Věk	Typ imunoglobulinu	Materiál
Pacient 1	Žena	54	IgM	sérum
Pacient 2	Muž	73	IgM	sérum
Pacient 3	Žena	78	IgM	sérum
Pacient 4	Žena	83	IgM	sérum
Pacient 5	Muž	61	IgM	sérum
Pacient 6	Muž	61	IgM	sérum
Pacient 7	Muž	64	IgM	sérum
Pacient 8	Muž	59	IgM	sérum
Pacient 9	Muž	66	IgM	sérum
Pacient 10	Žena	71	IgM	sérum
Pacient 11	Muž	66	IgM	sérum
Pacient 12	Muž	66	IgM	sérum
Pacient 13	Žena	32	IgM	sérum
Pacient 14	Žena	72	IgM	sérum
Pacient 15	Žena	57	IgM	sérum
Pacient 16	Žena	70	IgM	sérum
Pacient 17	Žena	74	IgM	sérum
Pacient 18	Muž	70	IgM	sérum
Pacient 19	Žena	76	IgM	sérum
Pacient 20	Muž	87	IgM	sérum
Pacient 21	Žena	66	IgM	sérum
Pacient 22	Muž	81	IgM	sérum
Pacient 23	Muž	63	IgM	sérum
Pacient 24	Žena	63	IgM	sérum
Pacient 25	Žena	80	IgM	sérum
Pacient 26	Muž	53	IgM	sérum
Pacient 27	Muž	69	IgM	sérum
Pacient 28	Žena	43	IgM	sérum
Pacient 29	Muž	71	IgM	sérum
Pacient 30	Muž	63	IgM	sérum
Pacient 31	Muž	56	IgM	sérum
Pacient 32	Muž	70	IgM	sérum
Pacient 33	Žena	83	IgM	sérum
Pacient 34	Muž	61	IgM	sérum

Pacient 35	Žena	32	IgM	sérum
Pacient 36	Žena	71	IgM	sérum
Pacient 37	Žena	78	IgM	sérum
Pacient 38	Žena	78	IgM	sérum
Pacient 39	Žena	72	IgM	sérum
Pacient 40	Muž	73	IgM	sérum
Pacient 41	Žena	70	IgM	sérum
Pacient 42	Žena	63	IgM	sérum
Pacient 43	Muž	74	IgG	sérum
Pacient 44	Žena	69	IgG	sérum
Pacient 45	Žena	62	IgG	sérum
Pacient 46	Žena	72	IgG	sérum
Pacient 47	Muž	55	IgG	sérum
Pacient 48	Žena	63	IgA	sérum
Pacient 49	Žena	62	IgA	sérum
Pacient 50	Žena	51	IgG	sérum
Pacient 51	Žena	57	IgG	sérum
Pacient 52	Muž	69	IgG	sérum
Pacient 53	Muž	64	IgA	sérum
Pacient 54	Muž	62	IgG	sérum
Pacient 55	Muž	68	IgG	sérum
Pacient 56	Muž	66	IgA	sérum
Pacient 57	Muž	73	IgG	sérum
Pacient 58	Žena	77	IgA	sérum
Pacient 59	Muž	67	IgG	sérum
Pacient 60	Žena	60	IgA	sérum
Pacient 61	Žena	54	IgG	sérum
Pacient 62	Žena	60	IgA	sérum
Pacient 63	Žena	73	IgG	sérum
Pacient 64	Žena	42	IgG	sérum
Pacient 65	Muž	71	IgG	sérum
Pacient 66	Muž	72	IgG	sérum
Pacient 67	Žena	80	IgG	sérum
Pacient 68	Muž	69	IgA	sérum
Pacient 69	Muž	56	IgG	sérum
Pacient 70	Muž	84	IgG	sérum
Pacient 71	Muž	66	IgG	sérum
Pacient 72	Muž	70	IgG	sérum
Pacient 73	Muž	68	IgG	sérum
Pacient 74	Žena	64	IgA	sérum
Pacient 75	Muž	47	IgA	sérum

Pacient 76	Žena	83	IgG	sérum
Pacient 77	Žena	79	IgG	sérum
Pacient 78	Žena	53	IgG	sérum
Pacient 79	Žena	57	IgG	sérum
Pacient 80	Žena	75	IgG	sérum
Pacient 81	Žena	65	IgG	sérum
Pacient 82	Muž	67	IgG	sérum

Příprava reagensí:

- Promývací pufr naředíme 10x, ke 100 ml se přidá 900 ml deionizované vody. Připravený promývací pufr uložíme do chladna, 2-8°C.
- K jednotlivým ampulím kalibrátorů (Cal) A-D se přidá 1 ml inkubačního pufru a po dobu 30 minut (z celkového časového intervalu uložíme regencie na 15 minut na víčko ampule) je ponecháme při teplotě 2-8°C.
- Kontrolní séra s vysokou (Con H) a nízkou hladinou (Con L) si připravíme přidáním 1 ml inkubačního pufru. Substance necháme rozpustit v chladnu při 2-8°C po dobu 30 minut (z celkového časového intervalu uložíme reagentie na 15 minut na víčko ampule).

Nachystáme si destičku s dostatečným počtem jamek k testování, v případě, že nejsou všechny jamky potřebné, vrátíme je ihned do sáčku se sušidlem.

Kyvety mikrotitrační destičky vymyjeme chlazeným promývacím puftrem 4x 300 µl. Kyvety je potřeba řádně vysušit a vyklepat. Poté napipetujeme jednotlivé substance po 100 µl. Kalibrátory (Cal) a kontroly se pipetují v dupletu za účelem vytvořit aritmetický průměr v případě, že by se jedna z hodnot vymykala z normy. Dále napipetujeme naředěné vzorky pacientů s prokázanou monoklonální protilátkou ve třídě IgM, v našem případě se jednalo o 42 pacientů a zbylé kyvety zaplníme naředěnými vzorky séra s potvrzeným výskytem paraproteinu ve třídě IgG nebo IgA (negativní kontrola). Během pipetování je potřeba uložit destičku na okamžik do chladna při teplotě 2-8°C.

Po napipetování všech substancí přikryjeme mikrotitrační destičku krycí fólií a necháme destičku inkubovat 2 hodiny při teplotě 2-8°C. Poté odstraníme fólii, vyprázdníme kyvety a promyjeme destičku chlazeným promývacím puftrem 4x 300 µl. V dalším kroku přidáme 100 µl enzymového markeru IgM do příslušných kyvet.

Destičku opět přikryjeme fólií a ponecháme ji inkubovat 2 hodiny při teplotě 2-8°C. Po uplynutí inkubační doby odstraníme fólii, vyprázdníme kyvety a promyjeme je chlazeným promývacím puřrem 4x 300 μ l. Následně přidáme 100 μ l substrátu TMB vytemperovaného na 18-28°C. Opět přikryjeme destičku fólií a umístíme ji na vertikální třepačku nastavenou na 800-1000 rpm po dobu 30 minut při teplotě 18-28°C. Destičku je třeba chránit před přímým světlem. V poslední fázi přidáme 100 μ l stopovacího roztoku. Tento krok je potřeba udělat do 30 minut. Pokud dojde ke vzniku vzduchových bublin, odstraníme je špičkou pipety. Do 30 minut změříme absorbanci při 450 nm pomocí přístroje EVOLIS.

4 Výsledky

4.1 Stanovení protilátek proti gangliosidům u pacientů s periferními neuropatiemi

4.1.1 Způsob vyhodnocení

Získané hodnoty z fotometrického měření při 450 nm nejsou konečným údajem. Výstupem měření jsou hodnoty absorbance, které se musí dle výrobce přepočítat pomocí vzorce uvedeného na „Obr. 7“. Výsledným údajem je poměr absorbance vzorků/kontrol a zprůměrované absorbance kalibrátorů v procentech.

Obrázek 7: Matematický vzorec pro výpočet konečné hodnoty

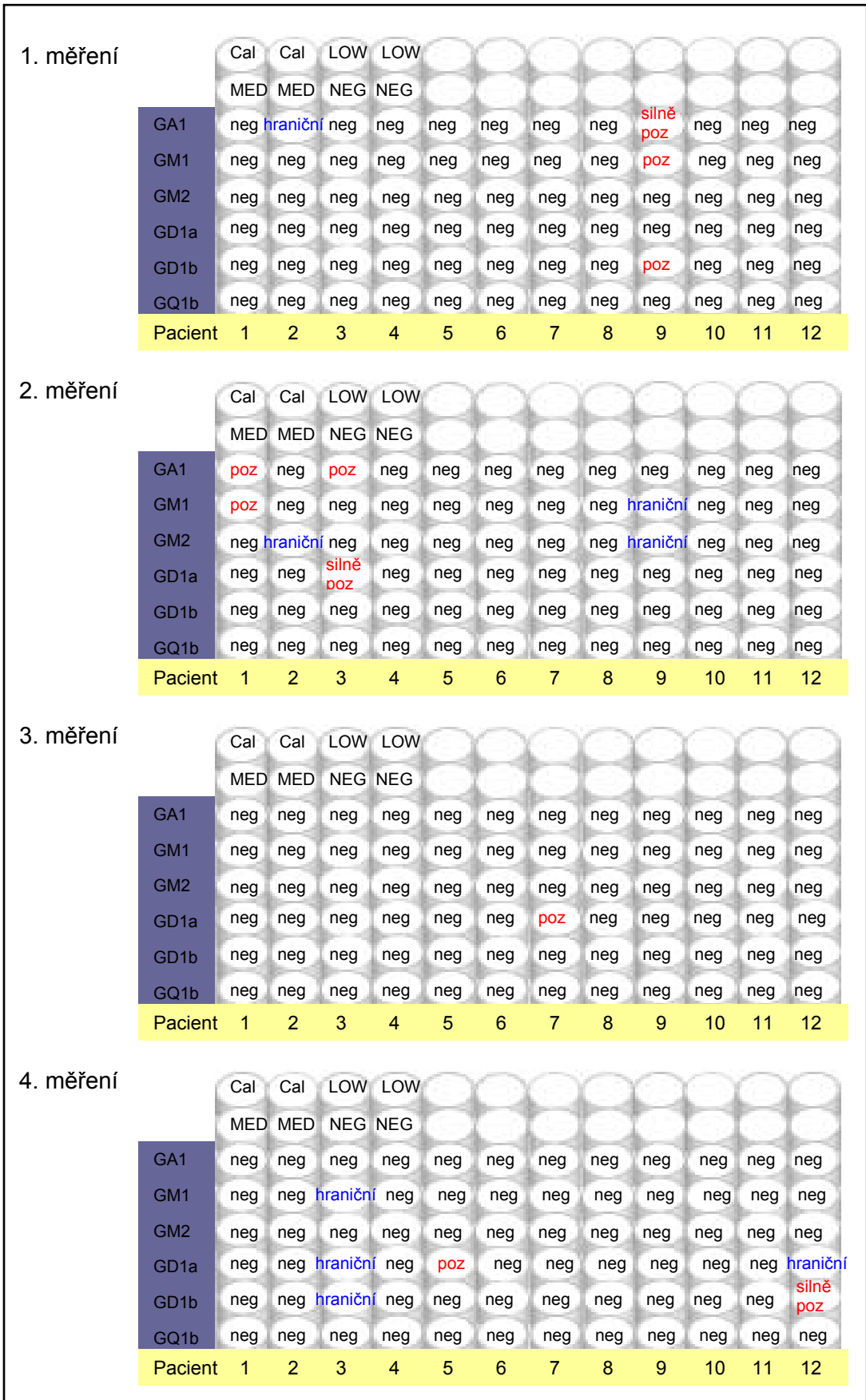
$$\frac{\text{Absorbance vzorků a kontrol}}{\text{Absorbance kalibrátorů}} \times 200 = \% \text{ poměr}$$

Získané údaje pacientů se následně vyhodnocují podle procentuálního zastoupení přiřazením k jednotlivým hodnotám, které jsou určeny výrobcem. Zastoupená rozmezí hodnot představují úroveň positivity/negativity uvedené v „Tab. 4“.

Tabulka 4: Cut off hodnoty odpovídající určitým absorbancím a jednotlivým kategoriím

Kategorie	Rozmezí	Absorbance
Negativní	pod 30%	0,28
Hraniční hodnoty	30-50%	0,28-0,46
Cut off hodnota	50%	0,46
Pozitivní	50-100%	0,46-0,92
Silně pozitivní	nad 100%	0,92

Kategorie hodnot byly zapsány k jednotlivým pacientům příslušných měření které jsou ilustračně zobrazeny na „Obr.8“



Obr. 8: Jednotlivá měření s vyznačenými kategoriemi pozitivity u vyšetřených pacientů

4.1.2 Vyhodnocení

Pozitivní nález:

V prvním měření byly prokázány pozitivní hodnoty autoprotilátek proti gangliosidům GM1, GD1b a silně pozitivní hodnoty anti-GA1 u muže ve věku 47 let s diagnostikovanou polyneuropatií označeného jako pacient 9.

Druhá detekce protilátek odhalila dva pacienty s abnormálními hladinami protilátek proti gangliosidům. Vysoké hladiny protilátek byly zjištěny u pacienta 1, kterým byla žena ve věku 81 let s diagnostikovanou polyneuropatií. Vysoké hodnoty byly prokázány u autoprotilátek proti GA1 a GM1. Druhý pacient, u kterého byly prokázány patogenní protilátky proti gangliosidům byla osoba označená jako pacient 3, kterým byl muž ve věku 78 let s polyneuropatií. V tomto případě se jednalo o protilátky proti gangliosidům GA1 a GD1a, přičemž hladina protilátek proti GD1a byla silně pozitivní.

Ve třetím stanovení byla zjištěna vysoká hladina autoprotilátek proti gangliosidům GD1a u muže ve věku 72 let s polyneuropatií. Tento pacient byl označen jako pacient 7.

Ze čtvrtého měření vzešli dva pacienti s vysokými hodnotami anti-gangliosidových protilátek. U pacienta 5, žena ve věku 52 let s polyneuropatií, byla prokázána vysoká hladina protilátek proti gangliosidům GD1a. Další abnormální hodnoty byly naměřeny u muže ve věku 61 let s diagnostikovaným Guillain-Barrého syndromem pod označením pacient 12, u kterého byly zjištěny hraniční hodnoty protilátek proti gangliosidu GD1a a silně pozitivní hodnoty protilátek proti gangliosidu GD1b.

Hraniční nález:

Hraniční nález znamená, že nelze jednoznačně určit přítomnost patologie, ale ani ji vyvrátit. Výsledkem takového nálezu je vždy opakovaný odběr a vyšetření pro potvrzení nebo naopak vyloučení nemoci. V prvním měření byla prokázána nespecificky zvýšená hladina autoprotilátek proti gangliosidu GA1 u pacienta 2. Touto osobou je žena ve věku 85 let s diagnostikovanou polyneuropatií.

Při druhém stanovení protilátek byla u muže ve věku 75 let s diagnostikovanou polyneuropatií označeného jako pacient 2, zjištěna nespecificky zvýšená hodnota u anti-gangliosidových protilátek proti GM2. Další případ vykazující hodnoty anti-gangliosidových autoprotilátek na rozmezí positivity byla žena ve věku 48 let s diagnostikovanou polyneuropatií pod označením pacient 9. Přesněji byly zjištěny neobvyklé hodnoty protilátek proti GM1 a GM2.

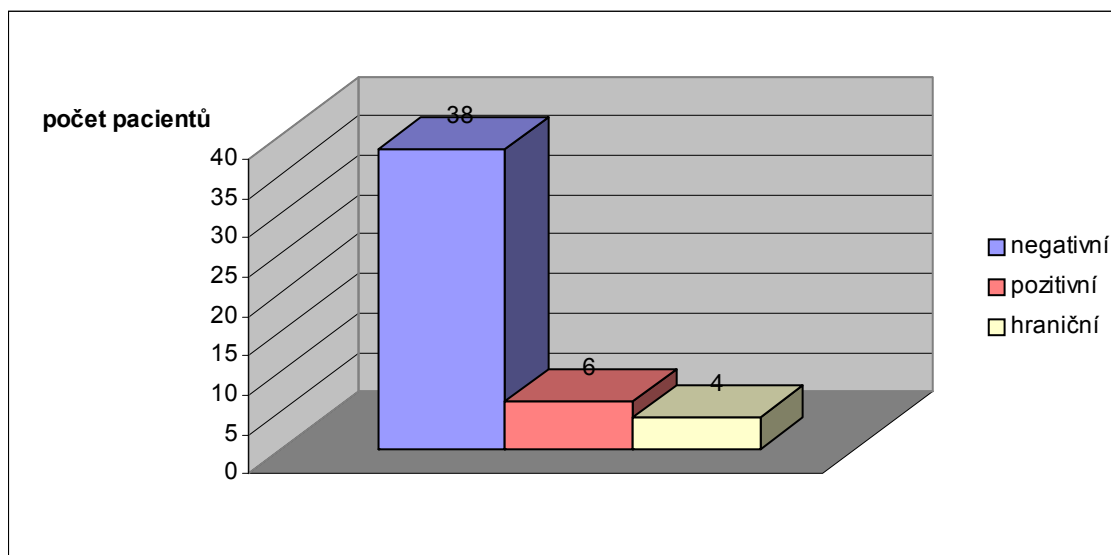
Při čtvrté detekci protilátek byly prokázány tři hraniční hodnoty positivity u protilátek proti gangliosidům GM1, GD1a a GD1b. Tyto hodnoty byly naměřeny u ženy ve věku 68 let označené jako pacient 3 a její diagnózou byla polyneuropatie.

Pacienti s pozitivními a hraničními hodnotami anti-gangliosidových protilátek jsou uvedeni v „Tab. 5“.

Tabulka 5: Souhrn výsledků pacientů s pozitivními a hraničními hodnotami protilátek proti gangliosidům

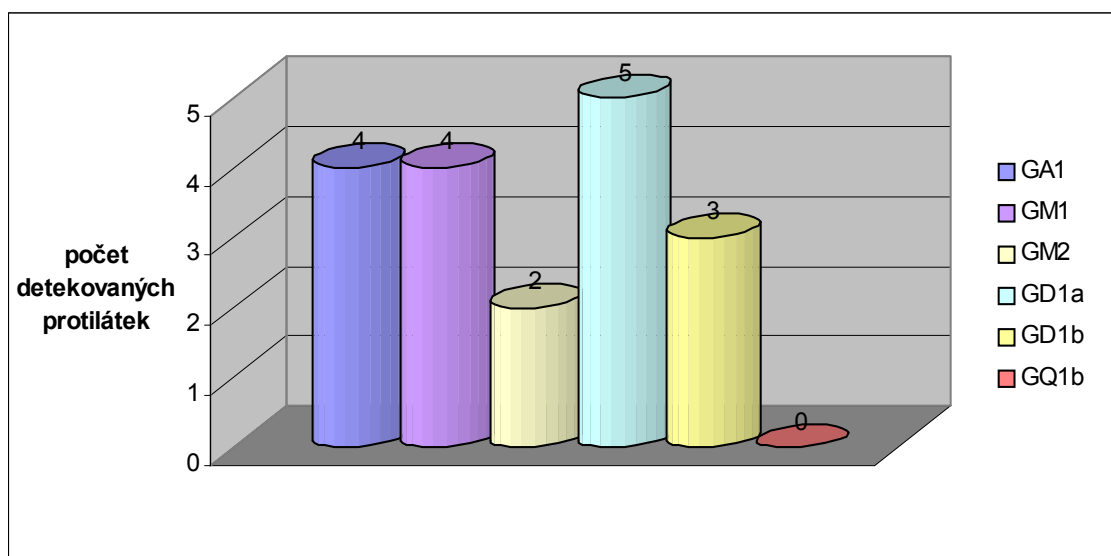
Stanovení	Označení pacienta	Pohlaví	Věk	Diagnóza	Pozitivita protilátek (%)	Hraniční hodnoty protilátek (%)
Stanovení 1	Pacient 2	Žena	85	G629		GA1 (44,5)
	Pacient 9	Muž	47	G629	GA1 (103,1), GM1 (72,5), GD1b (83,5)	
Stanovení 2	Pacient 1	Žena	81	G629	GA1 (66,9), GM1 (54,6)	
	Pacient 2	Muž	75	G629		GM2 (42,4)
	Pacient 3	Muž	78	G629	GA1 (57,8), GD1a (217,3)	
	Pacient 9	Žena	48	G629		GM1 (36,9), GM2 (30,7)
Stanovení 3	Pacient 7	Muž		G629	GD1a (61,4)	
Stanovení 4	Pacient 3	Žena	68	G629		GM1,(34,8) GD1a (34,9), GD1b (46,6)
	Pacient 5	Žena	52	G629	GD1a (57,2)	
	Pacient 12	Muž	61	G610	GD1b (284,8)	GD1a (32,1)

Na základě stanovení protilátek proti gangliosidům bylo z celkového počtu 48 pacientů objeveno 6 osob (15.8 %) s patologickými hodnotami těchto autoprottilátek a dále 4 osoby (10.5 %), u kterých se hladiny protilátek pohybovaly na pomezí pozitivních hodnot, 38 pacientů nevykazovalo přítomnost autoprottilátek. Zastoupení pacientů dle positivity je graficky zobrazeno na „Obr. 9“.



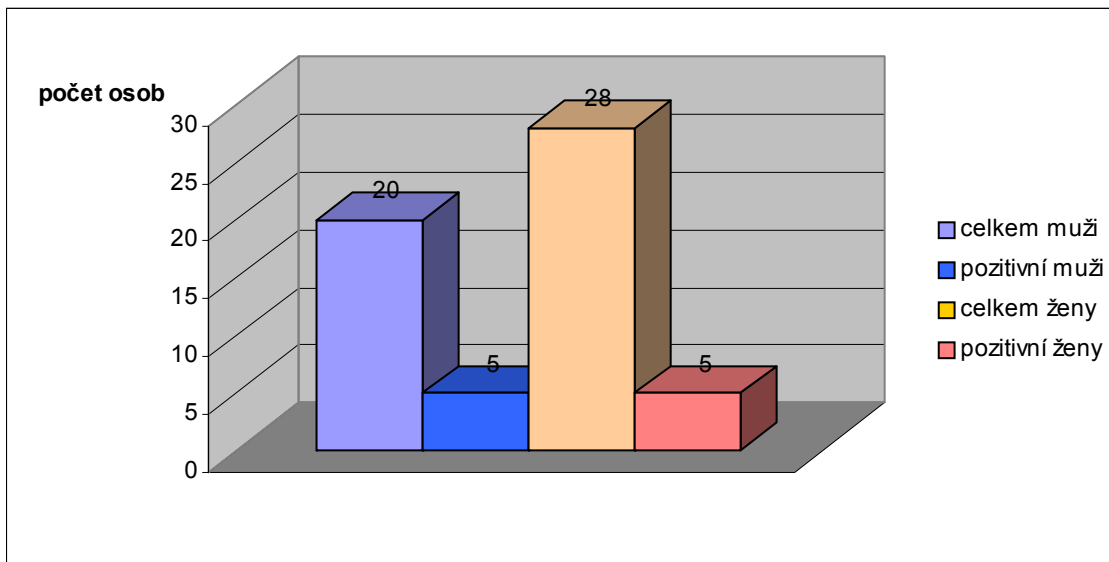
Obr. 9: Počet pacientů rozdělených dle pozitivity

Nejvíce zastoupenou anti-gangliosidovou protilátkou byla v našem měření autoproti látka proti GD1a, která byla prokázána u pěti pacientů. U čtyřech pacientů byly zjištěny autoproti látky proti gangliosidům GA1 a GM1. Protilátky proti GD1b jsme prokázali u třech pacientů. U dvou pacientů byla potvrzena přítomnost protilátek proti GM2, zatímco přítomnost anti-gangliosidových protilátek proti GQ1b nebyly prokázány u žádného z vyšetřovaných pacientů. Zastoupení jednotlivých autoproti látek proti gangliosidům u pozitivních i mezních pacientů je zobrazeno graficky na „Obr. 10“.



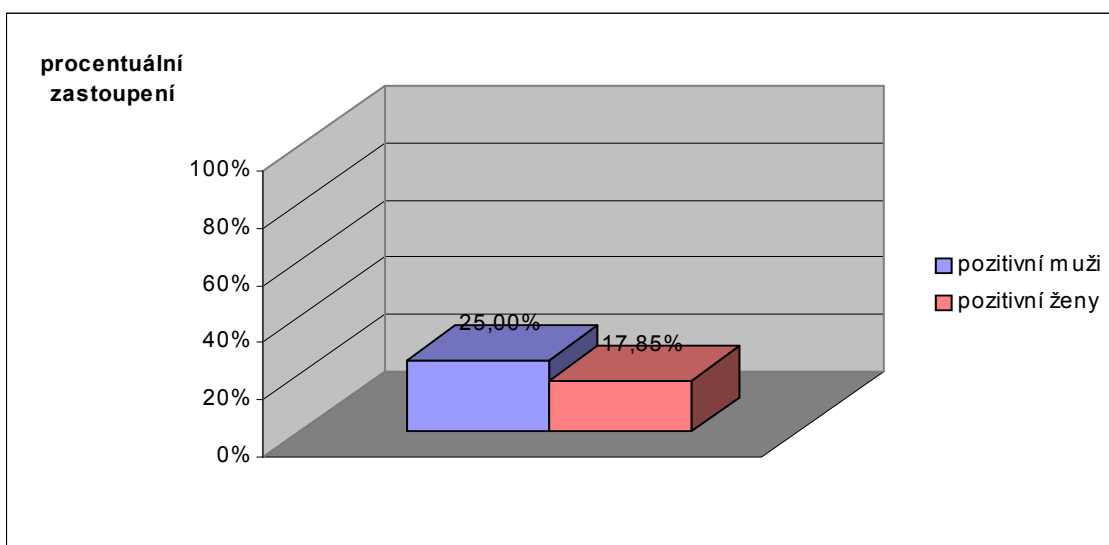
Obr. 10: Zastoupení jednotlivých anti-gangliosidových protilátek

Celkem bylo vyšetřeno 28 žen a 20 mužů. Počet osob s výskytem anti-gangliosidových autoprotilátek byl u obou pohlaví stejný. U mužů i žen bylo prokázáno 5 osob s pozitivním nálezem (jsou započteny i osoby s hraničními hodnotami). Rozdělení pacientů dle pohlaví a jejich zastoupení podle positivity je zobrazeno graficky na „Obr.11“.



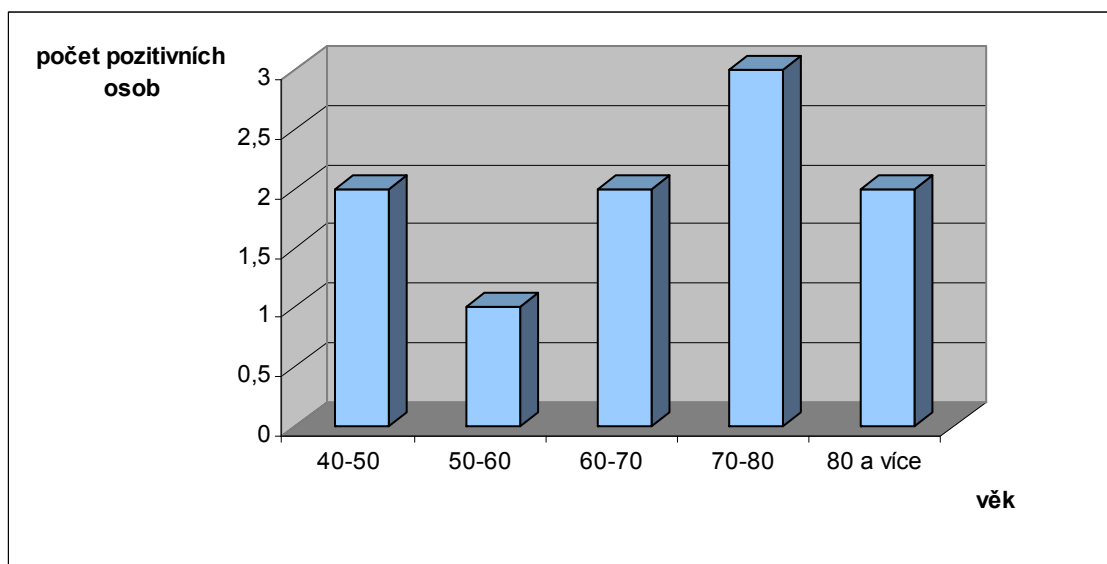
Obrázek 11: Rozdělení pacientů dle pohlaví a jejich positivity

Z dvaceti vyšetřených mužů na přítomnost anti-gangliosidových protilátek bylo objeveno pět osob s abnormálními hodnotami, což znamená, že každý čtvrtý muž byl v našem měření zachycen na přítomnost autoprotilátek. U žen byla incidence protilátek menší. Z dvaceti osmi žen byly prokázány autoprotilátky u pěti žen. Procentuální zastoupení obou pohlaví vzhledem k jejich celkovému počtu je graficky znázorněno na „Obr.12“.



Obrázek 12: Procentuální zastoupení mužů a žen vzhledem k jejich celkovému počtu

Průměrný věk všech vyšetřených pacientů byl 65,6 let. Průměrný věk žen byl 64,8 let, zatímco průměrný věk mužů byl 66,8 let. Přítomnost protilátek proti gangliosidům byla prokázána u pacientů ve věkovém rozpětí 47-85 let. Nejvíce pacientů, u nichž byla prokázána přítomnost autoprotiátek, se nacházelo ve věkové kategorii 70-80 let. Rozdělení pacientů s prokázanou přítomností anti-gangliosidových protilátek podle věkových kategorií je zobrazeno graficky na „Obr. 13“.



Obrázek 13: Rozdělení pozitivních pacientů podle věkových kategorií

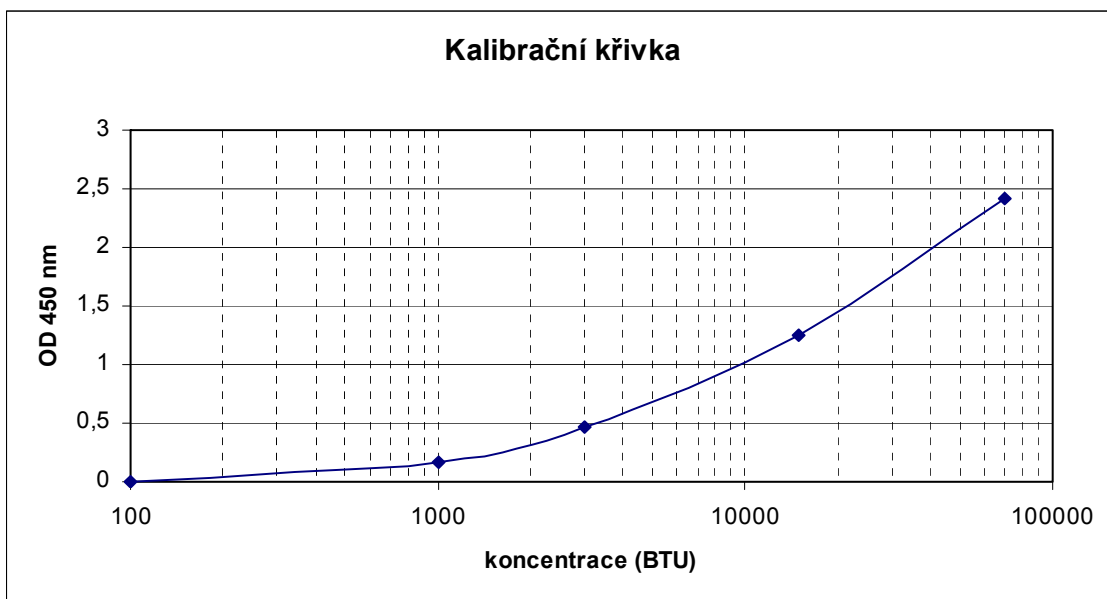
4.2 Stanovení protilátek proti MAG u pacientů s prokázanou monoklonální gamapatií

4.2.1 Způsob vyhodnocení

Výsledkem analýzy jsou kvantitativní hodnoty. Výstupem fotometrického analyzátoru jsou koncentrace, které jsou přepočítány pomocí kalibrační křivky. Výrobce doporučuje jako pozitivní kontrolu hodnotu cut off 1000 BTU (Bühlmann Titre Unit), což odpovídá nejnižšímu kalibrátoru D v kalibrační křivce. Zprůměrované hodnoty absorbance kalibrátorů našeho měření jsou uvedeny v „Tab. 6“. Pro získání koncentrace protilátek proti MAG ve vzorku, byla vytvořena kalibrační křivka viz „Obr. 14“. Koncentrace byly vypočteny pomocí analyzátoru EVOLIS. Hodnoty blanku odpovídaly nule. Hraniční hodnotou positivity byla koncentrace kalibrátoru D, pacienti nacházející se nad touto mezí byli určeni jako pozitivní, pacienti pohybující se v oblasti šedé zóny byli určeni jako hraniční.

Tabulka 6: Průměrné hodnoty absorpance kalibrátorů

Kalibrátor	OD ₄₅₀ (průměr)
Kal D (1000 BTU)	0,160
Kal C (3000 BTU)	0,463
Kal B (15000 BTU)	1,257
Kal A (70000 BTU)	2,412



Obrázek 14: Kalibrační křivka pro vyhodnocení anti-MAG protilátek

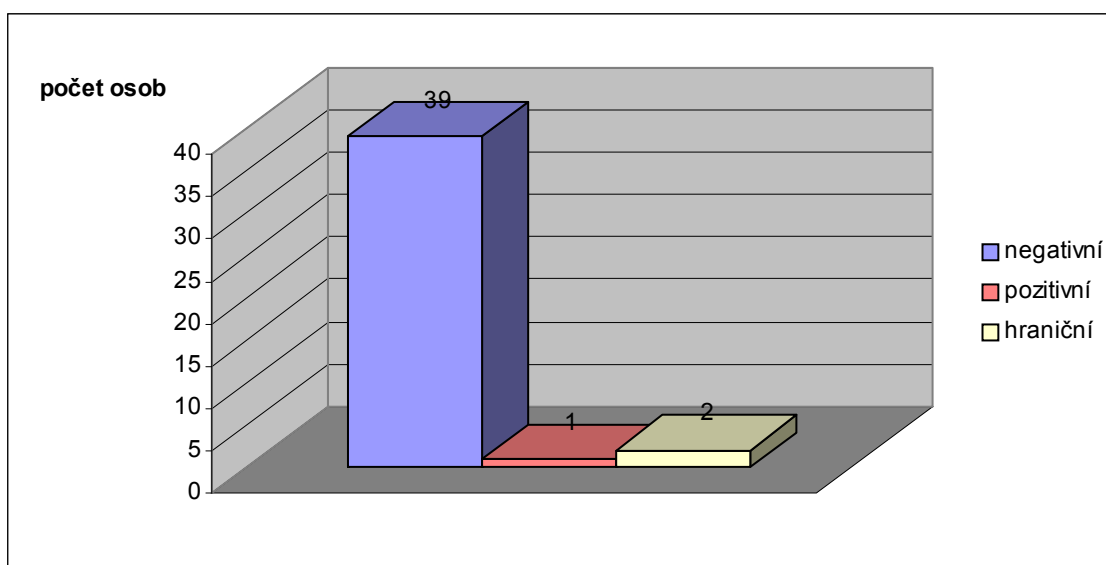
4.2.2 Vyhodnocení

Na základě detekce protilátek proti MAG metodou sendvičové ELISy byl zjištěn jeden pacient (žena, 76 let), u nějž byla prokázána přítomnost monoklonálního proteinu ve třídě IgM napadající myelin asociovaný glykoprotein. U dvou pacientů (žena, 74 let; žena, 80 let) byly naměřeny hraniční hladiny anti-MAG. U pacientů s hodnotami na rozhraní je doporučeno opakování vyšetření, protože u těchto osob se předpokládá počínající rozvoj onemocnění. Výsledky jsou zobrazeny na „Obr. 15“, kde je pozitivní pacient vyznačen červenou barvou a pacienti s hraničními hodnotami zelenou barvou. Modře jsou zvýrazněni pacienti s prokázanou přítomností monoklonálního proteinu ve třídě IgM, u kterých jsme předpokládali pozitivitu protilátek proti MAG. Žluté pole představuje negativní kontrolu, která zahrnuje osoby s výskytem monoklonálního proteinu ve třídě IgG/IgA.

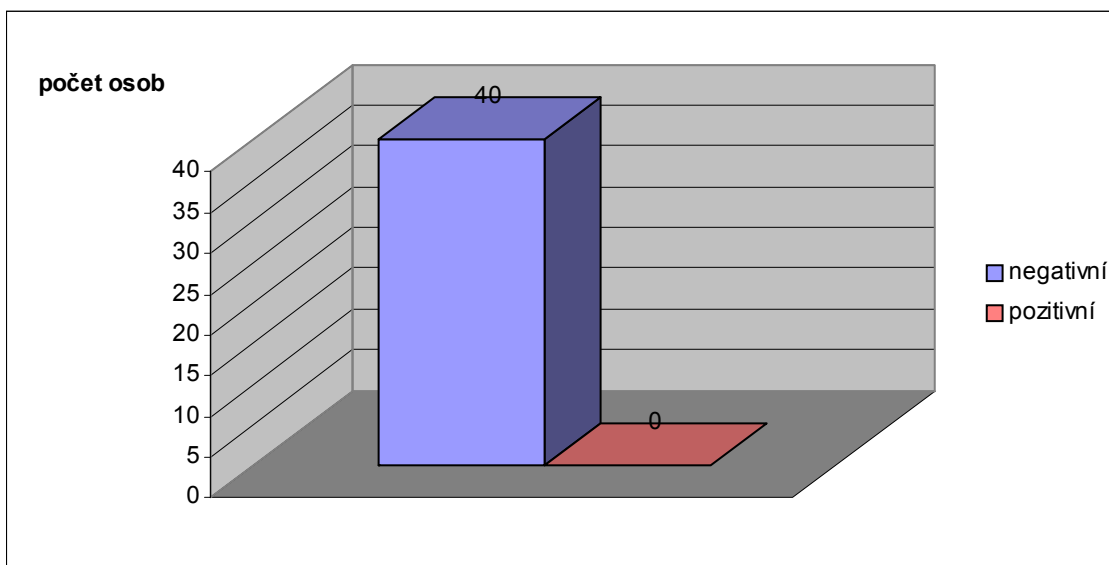
Cal A	Con L	3.	11.	19.	27.	35.	43.	51.	59.	67.	75.
Cal A	Con L	4.	12.	20.	28.	36.	44.	52.	60.	68.	76.
Cal B	Con H	5.	13.	21.	29.	37.	45.	53.	61.	69.	77.
Cal B	Con H	6.	14.	22.	30.	38.	46.	54.	62.	70.	78.
Cal C	blank	7.	15.	23.	31.	39.	47.	55.	63.	71.	79.
Cal C	blank	8.	16.	24.	32.	40.	48.	56.	64.	72.	80.
Cal D	1.	9.	17.	25.	33.	41.	49.	57.	65.	73.	81.
Cal D	2.	10.	18.	26.	34.	42.	50.	58.	66.	74.	82.

Obrázek 15: Mikrotitrační destička zobrazující pipetovací protokol a průkaz positivity u jednoho pacienta a hraničních hodnot u dvou pacientů, (modré pole – osoby s IgM, žluté pole – osoby s IgG/IgA).

Pro detekci autoprotilátek proti myelin asociovanému glykoproteinu bylo vybráno dohromady 82 pacientů, 42 pacientů s potvrzenou přítomností monoklonálního proteinu ve třídě IgM a 40 osob s výskytem paraproteinu ve třídě IgG/IgA. Ze 42 možných kandidátů na přítomnost protilátek proti MAG byla prokázána jedna pozitivní osoba a dvě osoby s hraničními hodnotami anti-MAG autoprotilátek. Zastoupení pacientů dle positivity je zobrazeno graficky na „Obr. 16“. U pacientů ve skupině negativní kontroly nebyla prokázána přítomnost autoprotilátek, viz „Obr.17“.

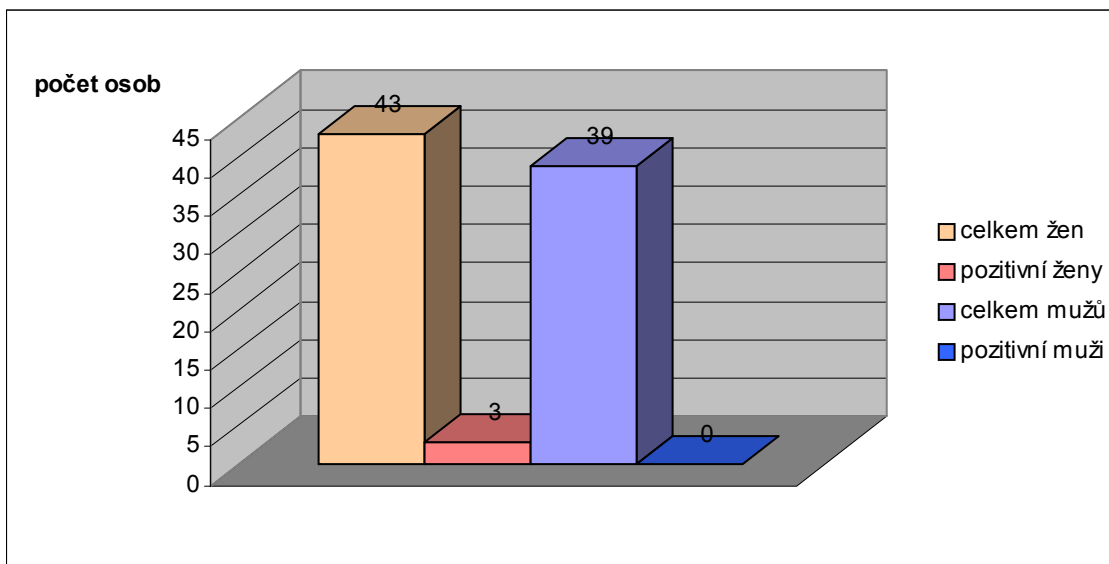


Obrázek 16: Rozdělení cílové skupiny pacientů podle positivity



Obrázek 17: Rozdělení kontrolní skupiny pacientů dle positivity

V celkovém počtu vybraných pacientů bylo 43 žen a 39 mužů. Z vybraných žen měly 3 ženy neobvyklé hodnoty protilátek proti MAG. U mužů nebyl prokázán výskyt anti-MAG protilátek. Rozdělení pacientů dle pohlaví a jejich positivity je uvedeno na „Obr.18“. Z grafu vyplývá, že se nám podařilo detekovat přítomnost autoprotiátek anti-MAG pouze u žen.



Obrázek 18: Rozdělení pacientů podle pohlaví a jejich positivity

5 Diskuse

5.1 Anti-gangliosidové protilátky

Guillain-Barrého syndrom (GBS) není obvyklé autoimunitní onemocnění a i v současnosti chybí studie v oblasti klinické i laboratorní diagnostiky. V této práci jsme prověřili klinické prognostické znaky u 48 pacientů, u nichž byly prokázány příznaky, které by mohly potvrzovat diagnózu polyneuropatie nebo Guillain-Barrého syndromu. U těchto vybraných pacientů jsme předpokládali možný výskyt anti-gangliosidových protilátek, a proto byly vyšetřeny na přítomnost již zmíněných protilátek. Z celkového počtu vyšetřených bylo prokázáno 6 osob pozitivních, což je 15,8%. Literatura uvádí, že incidence tohoto onemocnění je 1,2-1,9 na 100 000 obyvatel (Pithadia & Kakadia, 2010, Langmuir et al., 1984). Vysoké procento námi zachycených pacientů je dáno díky specifickému výběru pacientů. Ve skupině mužů bylo detekováno více pozitivních pacientů (1,4x) než ve skupině žen, dle „Obr. 12“. Tento nálezn zcela koreluje s literaturou, která uvádí, že muži jsou touto chorobou postiženi 1,5krát častěji než ženy, což je v rozporu s jinými imunitně vyvolanými chorobami. (Steiner et al., 2010 ; Govoni & Granieri, 2001)

Všichni pozitivní pacienti se pohybovali ve věkovém rozmezí 47-85 let, z toho největší pozitivita byla prokázána u osob mezi 70-80 let jak je uvedeno v „Obr.13“. Naše výsledky zcela korelují s dostupnou literaturou, která uvádí, že incidence se zvyšuje s věkem od 1 případu na 100 000 osob ve věku 30 let po 4 případy na 100 000 obyvatel ve věku 75 let a více (Pithadia & Kakadia, 2010, Langmuir et al., 1984).

Dle výsledných měření byly u pozitivních pacientů objeveny různé varianty GBS, kterými jsou AMAN, AMSAN nebo GBS s ataxií.

Na základě měření byla u osoby označené jako pacient 9 (muž, 47 let, diagnóza: polyneuropatie), prokázána přítomnost autoproti látek proti GM1, GD1b a silně pozitivních autoproti látek proti GA1. Protilátky proti gangliosidům asialo-GM1 (GA1) a zvláště proti GD1b se často objevují ve spojení s výskytem protilátek proti GM1, protože tyto protilátky rozeznávají stejnou sacharidovou sekvenci (Koga et al., 2001). GA1 je obsažen v lidské periferní nervové tkáni, ale jeho umístění v periferním nervstvu a patogenetická role protilátek proti GA1 není známa. Protilátky proti GA1 mají presynaptický blokuující účinek v nervosvalovém spojení způsobený inhibicí napětím řízených vápenatých kanálů (Kaida & Kusunoki, 2010). Přítomnost GM1 je spojována s infekcí *Campylobacter jejuni* a ve většině případů nasvědčuje horší průběh nemoci (Havránek et al., 2008). GM1 protilátky se nacházejí ve spojitosti s amyotrofickou laterální sklerózou (ALS) stejně tak s Guillain-Barrého syndromem (internet 6). Na základě získaných informací tedy usuzujeme, že tento pacient trpí

Guillain-Barrého syndromem, přesněji senzomotorickou neuropatií spíše zaměřenou na motorické nervy a možnou ataxií, čemuž nasvědčuje přítomnost autoprotilátek proti GD1b. Diagnóza tohoto pacienta je podpořena i skutečností, že se jedná o muže. Věkem není pacient zcela specifický, avšak není vyloučený. Vzhledem k věku by měla nastat terapie doplněná rehabilitacemi a léky zaměřenými na bolest nebo jiné symptomy. Postižený má velké šance na uzdravení. Léčba je zaměřena především na imunomodulaci a to podáním vysokých dávek intravenózních imunoglobulinů zkráceně HDIVIG nebo plazmaferézou (Bednařík, 2001; Havránek et al., 2008). Tyto metodiky jsou účinné v případě, že je léčba zahájena do 2 týdnů od rozvoje nemoci. Prvotním impulsem pro imunomodulační léčbu je neschopnost chůze (Bednařík, 2001; Van der Meché et al., 1992). V minulosti se podávaly kortikoidy, u kterých se však v poslední době neprokázal terapeutický efekt, pouze při podání společně s HDIVIG, kdy mohou zkrátit progresivní průběh nemoci. Při nemožnosti podat HDIVIG nebo provést plazmaferézu se aplikuje výměnná transfúze (Havránek et al., 2008; Baranwal et al., 2006). Léčba akutního stádia nemoci je účinná. Až 75% pacientů se zcela uzdraví nebo přetrvává pouze distální slabost či lehká únava (Ehler et al., 2011). V případě nevratného poškození tkáně je jedinou možnou léčbou substituční terapie nebo transplantace zničeného orgánu (Hořejší & Bartůňková, 2009; internet 1). Naprosté uzdravení během 3-12 měsíců se udává u 90-95% pacientů a u 5-10% pacientů se prokáží trvalé následky. Průměrné věkové rozpětí výskytu GBS je 4-8 let. (Bednařík, 2001; Havránek et al., 2008)

Dalším pozitivním případem byla osoba označená jako pacient 1 (žena, 81 let, diagnóza: polyneuropatie). U této ženy byl prokázán pozitivní výskyt protilátek proti gangliosidům GA1, GM1. Některé protilátky proti GM1 reagují s GA1 a tudíž se v některých případech vzájemně doplňují (Koga et al., 2001). Gangliosid GM1 je také spojován s infekcí *Campylobacter jejuni* (Havránek et al., 2008). Výskyt protilátek proti GM1 bývá znakem motorické neuropatie u GBS (AMAN, AMSAN) (Malíčková et al., 2007; internet 9). Na základě všech dostupných informací lze předpokládat, že pacientka trpí GBS přesněji motorickou formou. Díky našim výsledkům byla pacientce změněna diagnóza. Z epidemiologického hlediska je rovněž diagnóza podpořena, protože s věkem se zvyšuje incidence onemocnění. Vzhledem k vysokému věku pacientky se domnívám, že její vyhlídky na léčbu nejsou příliš příznivé. Léčebnou variantou by měla být HDIVIG a symptomatická léčba v případě výskytu bolestí či jiných potíží. Plazmaferéza se v tomto věku nedoporučuje, pro pacienta znamená velkou zátěž.

U pacienta označeného jako pacient 3 (muž, 78 let, diagnóza: polyneuropatie) byly prokázány pozitivní hodnoty autoprotilátek proti GA1 a silně pozitivní hodnoty proti

GD1a. Protilátky rozpoznávající gangliosidy GD1a a GA1 jsou často prokázány ve vztahu s motorickou a senzomotorickou neuropatií, jako je GBS (internet 6). Jak již bylo zmíněno role protilátek proti GA1 není zcela objasněna, zatímco velmi vysoké hodnoty výskytu protilátek proti GD1a jsou znakem AMAN, AMSAN (Malíčková et al., 2007). Podle odborné literatury lze potvrdit, že pacient trpí motorickou či senzomotorickou neuropatií, jako je GBS. Měření tak pomohlo stanovit diagnózu, kterou je opět Guillain-Barrého syndrom. Diagnóza je podpořena také epidemiologickými údaji, protože pozitivním pacientem je osoba mužského pohlaví vyššího věku. S ohledem na věk pacienta by měly být hlavní léčebnou terapií nasazeny vysoké dávky intravenózních imunoglobulinů jako v předchozím případě. Terapie by měla být samozřejmě zaměřena také na utišení bolesti i na jiné potíže vyskytující se u nemocných či hospitalizovaných osob.

Pacient 7 (muž, 72 let, diagnóza: polyneuropatie) vykazoval pozitivní hodnoty autoprottilátek proti gangliosidu GD1a. Motorické i senzorické nervy obsahují GD1a, ale jeho přesné umístění není známo. Protilátky proti GD1a inhibují obnovu poškozených periferních nervů u pacientů s AMAN. Protilátky proti gangliosidům GD1a jsou charakteristickým znakem AMAN, AMSAN, jejichž projevy jsou spíše motorického charakteru (Kaida & Kusunoki, 2010). Na základě měření a literatury lze usoudit, že pacient trpí senzomotorickou formou GBS. Diagnózu podporují i epidemiologické údaje, protože postiženým je muž ve vyšším věku. Léčba pacienta bude vzhledem k věku spíše zaměřena na imunomodulační a symptomatickou terapii. Léčba plazmaferézou není v tomto případě vhodná.

Osoba označená jako pacient 5 (žena, 52 let, diagnóza: polyneuropatie) se prokázala pozitivními hodnotami u anti-gangliosidových protilátek typu GD1a. Na základě již zmíněné literatury usuzujeme, že pacientka trpí variantou Guillain-Barrého syndrom, tedy senzomotorickou neuropatií spíše zaměřenou na motorické projevy. Stanovením anti-gangliosidových autoprottilátek u tohoto pacienta jsme pomohli upřesnit diagnózu. Diagnózu podporují i epidemiologické údaje, protože i když se jedná o ženu, řadí se do věkově rizikovější skupiny. Vzhledem k věku by měla být pacientce nasazena léčba podáním HDIVIG či výměnnou plazmaferézou. Dále může být léčba pacientky podpořena symptomatickou léčbou a rehabilitacemi. Tato osoba má poměrně velké šance na uzdravení.

Poslední pacient, který byl klasifikován jako pozitivní na přítomnost protilátek proti gangliosidům, byla osoba označena jako pacient 12 (muž, 61 let, diagnóza: Guillain-Barrého syndrom). V tomto případě byly prokázány silně pozitivní hodnoty protilátek proti gangliosidu GD1b a mezní hodnoty protilátek proti GD1a. Monospecifické protilátky proti GD1b vyvolávají ataxii u pacientů trpících GBS. Klíčovou

roli ve vývoji ataxie hraje aktivace apoptické kaskády. Protilátky proti GD1a jsou spojovány s motorickými poruchami u GBS (Willison & Yuki, 2002; Gong et al. 2001). Pacient podle dostupných informací trpí ataxií u GBS s počínajícími poruchami motorických nervů. I když nebyla potvrzena přítomnost všech anti-gangliosidových autoprotiátek specifických pro GBS, klinicky byla u tohoto pacienta ověřena diagnóza GBS. Diagnózu také podporují epidemiologické údaje, protože postiženou osobou je muž ve vyšším věku, čímž se dle literatury zvyšuje pravděpodobnost rozvoje onemocnění. Pacientovi by měla být nasazena imunomodulační léčba ve formě HDIVIG či plazmaferézy. Dále pacienta čekají rehabilitace pro celkovou rekonvalescenci. Průběh léčby by měl být podpořen i léčbou dalších příznaků jak fyzických tak psychických.

Zvláštní skupinu pacientů zahrnují osoby, u nichž nebyly jednoznačně potvrzeny patologické hodnoty anti-gangliosidových protilátek vedoucí k vývoji GBS, ale ani vyvráceny. Těmto pacientům je doporučeno podstoupit nový odběr a vyšetření pro potvrzení resp. vyloučení onemocnění. Hraniční hodnoty jsou neprůkazné, proto mohou být známkou i jiných chorob. Jedním z těchto případů je pacient (žena, 85 let, diagnóza: polyneuropatie), který byl označen jako pacient 2. U této osoby byly naměřeny hodnoty autoprotiátek těsně pod hranicí positivity proti gangliosidu GA1. Zvýšená hladina těchto protilátek může být příčinou počínajících nervosvalových poruch, nebo mohou být znakem začínajícího rozvoje nespecifické infekce vyvolávající autoimunitní odpověď.

Dalším pacientem s hraničním nálezem byl pacient 2 (muž, 75let, diagnóza: polyneuropatie). V tomto případě byla prokázána hraniční hodnota anti-gangliosidových protilátek proti GM2. Přítomnost anti-GM2 protilátek je hlavním znakem GBS po infekci *Cytomegalovirem* (Malíčková et al., 2007; internet 9).

Abnormální hodnoty byly naměřeny i v případě pacienta s číslem 9 (žena, 49 let, diagnóza: polyneuropatie). U této osoby byly zjištěny hraniční hladiny protilátek proti gangliosidům GM1, GM2. Zvýšené hodnoty protilátek proti GM1 ve třídě IgG mohou být znakem počínající motorické neuropatie u GBS, dále mohou znamenat počátek multifokální motorické neuropatie, jedná-li se o protilátky ve třídě IgM (Malíčková et al., 2007; internet 9). Zvýšené hodnoty autoprotiátek proti gangliosidům GM2 mohou být opět příčinou rozvíjející se infekce *Cytomegalovirem*, který je původcem rozvoje GBS. Hodnoty jsou neprůkazné, proto mohou být způsobeny i jinou nespecifickou infekcí vyvolávající autoimunitní proces. Podle epidemiologických dat nezastupuje pacient nejrizikovější skupinu nemocných, ale přesto není onemocnění vyloučeno. Pacientovi

byl doporučen nový odběr krve a vyšetření pro sledování vývoje možného onemocnění.

Posledním pacientem, u kterého byly detekovány hraniční hodnoty, byla osoba pod označením pacient 3 (žena, 58 let, diagnóza: polyneuropatie). U této osoby byly zjištěny mezní hodnoty autoprotilátek proti gangliosidům GM1, GD1a a GD1b. Toto přesné zastoupení anti-gangliosidových protilátek je specifické pro Guillain-Barrého syndrom dle odborné literatury i výrobce. Domníváme se, že díky stanovení anti-gangliosidových protilátek byl u pacienta odhalen počínající rozvoj GBS. Na základě epidemiologických údajů se osoba řadí do skupiny lidí s rizikem možného vývoje nemoci. Tomuto pacientovi bylo doporučeno podstoupit nový odběr i vyšetření pro posouzení vývoje onemocnění.

5.2 Anti-MAG protilátky

Diagnostikovat anti-MAG neuropatii, která se vyskytuje ve spojení s monoklonální gamapatií nejasného významu, má velký klinický význam. Vyšetření protilátek proti myelin asociovanému glykoproteinu je velmi důležité, protože jejich přítomnost predikuje aktivní proces demyelinizace u periferních neuropatií. Terapie pacientů trpících monoklonální gamapatií nejasného významu s projevy neuropatie je v současnosti zaměřena pouze na symptomatickou léčbu, protože primární příčina onemocnění není známa. Prokázáním přítomnosti anti-MAG protilátek se u pacientů docílí změny medikace se zaměřením na léčbu autoimunitního onemocnění, kterým tato neuropatie je. V současnosti mohou lékaři ovlivnit pouze konečné projevy, jako je bolest, parastézie a jiné. Tímto měřením se také zpřesní diagnóza, protože pacienti s polyneuropatiemi jsou velmi těžko diagnostikovatelní. Projevy jednotlivých polyneuropatií se navzájem prolínají, přičemž původcem mohou být mimo autoimunitního onemocnění: alkoholismus, metabolické nemoci jako diabetes, vitaminové deficity a další (Otruba, 2011).

V měření bylo vyšetřeno 42 pacientů s prokázanou přítomností monoklonálního proteinu ve třídě IgM. U této skupiny osob jsme předpokládali možný nález anti-MAG protilátek. Pro negativní kontrolu bylo využito 40 pacientů s přítomností paraproteinu IgG nebo IgA. Z grafu na „Obr. 17“ vyplývá, že v kontrolní skupině pacientů s prokázanou přítomností paraprotieny IgG a IgA jsme nenalezli žádného pozitivního pacienta. Jak již bylo zmíněno, přítomnost anti-MAG protilátek se pojí s paraproteinem IgM, což jsme tímto nálezem i prokázali. Z epidemiologického hlediska monoklonální gamapatie nejasného významu postihuje 3 % lidské populace s věkem nad 70 let a víc jak u jedné třetiny pacientů s MGUS se projevuje periferní neuropatie. Přesná čísla

pojednávací o incidenci anti-MAG neuropatie nejsou známa (Ščudla & Pika, 2009; IMWIG). V našem stanovení se podařilo zachytit jednoho pacienta s prokázanou přítomností anti-MAG autoprotilátek ve třídě IgM a dva pacienty s hraničními hodnotami, jak vyplývá z grafu na „Obr. 16“. Výsledný nález anti-MAG protilátek u tří pacientů je v ohledu malé četnosti výskytu tohoto onemocnění velký záchyt. Dle vyjádření ošetřujícího lékaře byla díky našim výsledkům pacientce změněna léčba, jejíž hlavní terapeutickou strategií je imunomodulace. Hlavní léčebná strategie zahrnuje intravenózní imunoglobuliny, steroidy, plazmaferézu, alkalická činidla jako cyklofosfamid (internet 8; Živkovič et al., 2009). Nejúčinnější léčebnou metodou je prozatím terapie cyklofosfamidem a plazmaferézou (Bednařík, 2001). V některých případech anti-MAG neuropatie má efektivní účinky rituximab. Ideální způsob léčby neuropatie s monoklonální gamapatií prozatím neexistuje (internet 8; Khadilkar et al., 2011). Pacientům s hraničními hodnotami bylo doporučeno opakovat odběry krve a vyšetření, pro upřesnění resp. vyloučení diagnózy. Je pravděpodobné, že vzhledem k výsledku bude následující vyšetření pozitivní. Pokud ano, podařilo se nám detekovat počínající rozvoj anti-MAG neuropatie, a tím i možnost včasné léčby a následného vyléčení. Všechny postižené osoby byly zástupci ženského pohlaví, což vychází z grafu na „Obr.18“. Tato skutečnost potvrzuje obecný předpoklad, že ženy mají větší sklon k rozvoji autoimunitního onemocnění, jehož příčinou jsou hormonální změny (internet 1), ale přesto by dle Kawagashira et al. měli být anti-MAG neuropatií postiženi spíše muži.

Pro tuto práci byla formulována hypotéza: „Pokud je monoklonální gamapatie prokazatelně způsobena protilátkami anti-MAG IgM, lze tyto pacienty cíleně léčit odlišným způsobem a pokud ano, jak je ovlivněna možnost vyléčení“.

Podle získaných informací nebyla hypotéza z části potvrzena. Neproklázali jsme, že anti-MAG protilátky jsou příčinou monoklonální gamapatie, protože dle literatury reagují paraproteiny ve třídě IgM s nervovými antigeny, kterým je i MAG (Gabriel et al., 1996; Nobile-Orazio et al., 2000). Monoklonální gamapatie se tedy jeví jako původní příčina možného nástupu neuropatie. Rozvoj neuropatie je pak patologický proces doprovázející monoklonální gamapatii. Dosud však nebyl zcela objasněn vznik i vývoj periferní neuropatie u pacientů s monoklonální gamapatií (Ramchandren & Lewis, 2012). Tato interakce následně vede k aktivaci komplementu a nervovému poškození (Ramchandren & Lewis, 2012; Khadilkar et al., 2011). Popsaný patofyziologický proces je tedy příkladem protilátkami vyvolané demyelinizace (Tatum, 1993). Avšak pacienti s přítomností anti-MAG protilátek jsou léčeni odlišným způsobem. Pokud se patologický proces objeví včas, lze destrukce nervové tkáně

potlačit a zbavit pacienta neurologických příznaků a destrukce mozkové tkáně. Léčba anti-MAG neuropatie s monoklonální gamapatií by měla být na základě získaných informací léčena jako autoimunitní onemocnění s důrazem na imunomodulační léčbu.

6 Závěr

Náplní práce bylo vypracovat literární rešerši na dané téma, což znamenalo získat a zpracovat širokou oblast dat zabývající se problematikou periferních neuropatií a jejich diagnostiky zahrnující protilátky proti gangliosidům a proti myelin asociovanému glykoproteinu.

Specifickým výběrem pacientů jsme vzhledem k epidemiologickým údajům dosáhli vysokého záchyty onemocnění. V případě diagnózy Guillain-Barrého syndromu jsme prokázali přítomnost anti-gangliosidových protilátek u deseti osob, z toho u šesti byli prokázány pozitivní hodnoty těchto autoprotiátek a byla jim přiřazena diagnóza Guillain-Barrého syndromu. Zbylým čtyřem pacientům byla prokázána přítomnost autoprotiátek, ale jejich hodnoty odpovídaly hraničním hodnotám positivity. Těmto osobám byl doporučen nový odběr krve a opakování vyšetření pro vyvrácení nebo potvrzení diagnózy. Vyšetřením anti-MAG protilátek u pacientů s prokázanou monoklonální gamapatií ve třídě IgM jsme na základě epidemiologických údajů zachytili velký počet osob. Při měření byl prokázán jeden pacient s pozitivními hodnotami a dva pacienti s neprůkaznými hodnotami positivity, tedy hodnotami hraničními. Pozitivnímu pacientovi, který měl již potvrzenou přítomnost paraproteinu ve třídě IgM, byla díky vyšetření zjištěna i anti-MAG neuropatie. U pacientů s mezními hodnotami anti-MAG protilátek bylo doporučeno opakování odběru krve a vyšetření pro monitorování vývoje onemocnění. Prokázali jsme, že stanovení anti-MAG a anti-gangliosidových protilátek má velký klinický význam. Výhodou těchto vyšetření je rychlost stanovení protilátek, která je obecně u autoimunitních chorob zásadní. Včasná detekce a správné určení diagnózy je důležité pro nasazení adekvátní léčby vedoucí k zlepšení zdravotního stavu pacienta či úplného vyléčení, což potvrzují i naše výsledky.

Cílem této práce bylo zavést metody pro detekci autoprotiátek proti gangliosidům a proti myelin asociovanému glykoproteinu do klinické praxe. Součástí zavedení technik do rutinní laboratorní praxe bylo vytvořit standardní operační postup vyšetřovací, který zahrnuje bezpečnostní aspekty, princip metody, kalibrace, interpretace výsledků, informace o reagentech, pracovní postup a také stručný popis pracovního postupu pro následné užití laboranty v rutinním provozu. Obě metody by měly dále pomoci při stanovování diagnóz zaměřených na periferní neuropatie. Počtem zachycených pacientů jsme prokázali, že vybrané soupravy jsou dostatečně specifické a citlivé, a tudíž vhodné pro zamýšlené použití.

Potvrdili jsme, jak na základě výsledků, tak na základě klinických informací, že obě zavedené metody jsou velmi důležité a přínosné pro diagnostiku neuropatií. Tato vyšetření jsou vysoce specializovaná a musí být interpretována ve spolupráci

s klinikem. Problematika zabývající se periferními neuropatiemi je velmi rozsáhlá. Symptomy jednotlivých polyneuropatií se prolínají, není tedy jednoduché určit přesnou diagnózu i na základě pozitivního nálezu, proto je každý posun v diagnostice velmi cenný. Zavedení těchto metod do klinické praxe má tudíž významný diagnostický přínos. V současnosti jsou užité techniky vrcholem laboratorních vyšetření zaměřených na detekci protilátek proti glykokonjugátům pojících se s určitými typy neuropatií jako je Guillain-Barrého syndrom či anti-MAG neuropatie s monoklonální gamapatií ve třídě IgM na trhu. Prozatím neexistují žádné jiné, sofistikovanější metody vhodné pro stanovení a použití v rutinní praxi.

V diplomové práci jsme měli objasnit hypotézu: „Pokud je monoklonální gamapatie prokazatelně způsobena protilátkami anti-MAG IgM, lze tyto pacienty cíleně léčit odlišným způsobem a pokud ano, jak je ovlivněna možnost vyléčení“. Hypotézu jsme po posouzení všech dostupných informací z části potvrdili. Pomocí získaných výsledků a odborné literatury a na základě konzultace s klinikem jsme prokázali, že pacientům trpícím tímto onemocněním bude změněna léčba, která může vést až k úplnému uzdravení.

V práci jsme prokázali, že není jednoduché správně diagnostikovat pacienty vykazující příznaky neurologického postižení, nestačí se zaměřit pouze na projevy nemoci ale, je nutné hledat primární příčinu onemocnění. Dle mého názoru se díky zavedení obou metod do rutinní praxe urychlí a zpřesní diagnóza v oblasti neuropatií, což vede k možnosti cílená terapie, která zajistí lepší kvalitu života či úplné uzdravení.

7 Seznam použité literatury

Aldea P. J. J. (2012) Monoclonal antibodies in inflammatory disease of the muscle and peripheral nervous system. *Neurologia* **27**, 39-45.

Ang C. W., Jacobs B. C., Laman J. D. (2004) The Guillain Barré syndrome: true case of molecular mimicry. *Trends Immunol.* **25**, 61-66.

Ang C.W., Yuki N., Jacobs B. C. (1999) Rapidly progressive, predominantly motor Guillain-Barré syndrome with anti- GalNAc-GD1a antibodies. *Neurology* **53**, 2122–2127.

Ariga T. (2011) The role of sulfoglucuronosyl glycosphingolipids in the pathogenesis of monoclonal IgM paraproteinemia and peripheral neuropathy. *Proc. Jpn. Acad, Ser. B* **87**, 386-404

Asbury A. K., Arnason B. G., Adams R. D. (1969) The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis, its role in pathogenesis. *Medicine.* **48**, 173–215.

Azhar A. et al. (2002) Role of *Helicobacter pylori* Infection in the Incidence and Clinical Course of Monoclonal Gammopathy of Underdetermined Significance. *Am. J. Gastroenterol.* **97**, 1-4.

Baranwal A. K., Ravi R. N., Singh R. (2006) Exchange transfusion: a low-cost alternative for severe childhood Guillain-Barre syndrome. *J. Child. Neurol.* **21**, 960–965.

Bartůňková J., Hořejší V. (2009) Základy imunologie, pp. 154-162; 227-246, PB tisk, Triton, Praha, Czech Republic.

Bednařík J. (2001) Zánětlivé polyneuropatie. *Neurol. prax.* **3**, 115-121.

Bulsara K. R., et al. (2001) Guillain-Barre syndrome in organ and bone marrow transplant patients. *Transplantation* **71**, 1169-1183.

Caudie C. (2000) Monoclonal IgM Autoantibody Reactivity in M-IgM Peripheral Neuropathy. *Clin Rev Allergy Immunol.* **19**, 7-18.

Collins B. E. et al. (1997) Binding Specificities of the Sialoadhesin Family of I-type Lectins. *J. Biol. Chem.* **272**, 16889-16895.

Edgar J.M., Garben J. (2004) The Myelinated Axon Is Dependent on the Myelinating Cell for Support and Maintenance: Molecules Involved. *J. Neurosci. Res.* **76**, 593- 598.

Ehler E. (2009) Periferní neuropatie v ambulantní praxi. *Neurol. prax.* **1**, 34-38.

Ehler E. (2012) Polyneuropatie-klasifikace, diagnostika, terapie. *Practicus.* **8**, 17-21.

Ehler E., Derďáková M., Latta J., Mrklovský M. (2011) Akutní polyradikuloneuritida-diferenciální diagnostika. *Neurol. praxi* **3**, 181-187.

Feasby T. E., Gilbert J. J., Brown W.F., Bolton C. F., Hahn A. D., Koopman W. F., et al. (1986) An acute axonal form of Guillain-Barré polyneuropathy. *Brain* **109**, 1115-26.

Gabriel J.-M. et al. (1996) Selective loss of myelin-associated glycoprotein from myelin correlates with anti-MAG antibody titre in demyelinating paraproteinaemic polyneuropathy. *Brain* **119**, 775-787.

Gong Y., Lunn M. P., Heffer-Lauc M., Li C. Y., Griffin J. W., Schnaar R. L., et al. (2001) Localization of major gangliosides in the PNS: implications for immune neuropathies. *J. Periph. Nerv. Syst.* **6**, 142.

Gorson K. C., Ropper A. H, Weinberg D. H., Weinstein R. (2001) Treatment experience in patients with anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy. *Muscle Nerve* **24**, 778-786.

Gorson K. C., Ropper A. H. (1997) Axonal neuropathy associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **63**, 163-168.

Govoni V., Granieri E. (2001) Epidemiology of the Guillain–Barre syndrome. *Curr. Opin. Neurol.* **14**, 605–13.

Griffin J. W., Li C. Y., Ho T. W., Tian M., Gao C. Y., Xue P., et al. (1996) Pathology of the motor-sensory axonal Guillain- Barré syndrome. *Ann. Neurol.* **39**, 17-28.

Hafer-Macko C, Hsieh S-T, Li CY, Ho TW, Sheikh K, Cornblath DR, et al. (1996) Acute motor axonal neuropathy: an antibody-mediated attack on axolemma. *Ann. Neurol.* **40**, 635-44.

Havdrová E. a kolektiv (2001) Neuroimunologie, pp.37-38, 109, 297-307, Decibel Production s.r.o., Maxdorf Jessenius, Praha, Czech Republic.

Havránek J., Dedek V., Fajt M., Heinige P, Brosch K.(2008) Guillain-barré syndrom. *Pediatr.prax* **2**, 81-85.

Hughes R., Hadden R., Gregson N., Smith K. (1999) Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol.* **100**, 74–97.

Hughes R. A. C., Allen D., Makowska A., Gregson N. A. (2006) Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **11**, 30–46.

Kaida K., Kusunoki S. (2010) Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain–Barré syndrome and Fisher syndrome: Mini-review. *J.Neuroimmunol* **223**, 5-12.

Kaku D. A., England J. D., Summer A. J. (1994) Distal accentuation of conduction slowing in polyneuropathy associated with antibodies to myelin-associated glycoprotein and sulphated glucurohyl paragloboside. *Brain* **117**, 941-947.

Kawagashira Y. et al. (2010) IgM MGUS anti-MAG neuropathy with predominant muscle weakness and extensive muscle atrophy. *Muscle Nerve* **42**, 433-435.

Khadilkar S. V., Deshmukh S. S., Dhonde P. D. (2011) Chronic dysimmune neuropathies: Beyond chronic demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann. Indian. Acad. Neurol.* **14**, 81-92.

Koga M., Tatsumoto M. Yuki N. Hirata K. (2001) Range of cross reactivity of anti-GM1 IgG antibody in Guillain-Barré syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **71**, 123-124.

Koga M., Takahashi M., Masuda M. (2005) Campylobacter gene polymorphism as a determinant of clinical features of Guillain-Barré syndrome. *Neurology* **65**, 1376–1381.

Koga M., Gilbert M., Takahashi M., Li J., Koike S., Hirata K., Yuki N. (2006) Comprehensive analysis of bacterial risk factors for the development of Guillain-Barré syndrome after *Campylobacter jejuni* infection. *J. Infect. Dis.* **193**, 547–555.

Kovářová L., Hájek R. (2011) Prognostický význam imunofenotypizace u nemocných s monoklonální gamapatií nejasného významu a mnohočetným myelomem. *Klin. Biochem. Metab.* **19**, 96-100.

Krejsek J., Kopecký O., Taláb R. (2002) Imunopatogeneze roztroušené sklerózy. *Neurol. pro praxi.* **5**, 1-7.

Kuijf M. L. et al. (2007) Origin of ganglioside complex antibodies in Guillain–Barré syndrome. *J. Neuroimmunol.* **188**, 69-73.

Kusunoki S., Kaida Ki., Ueda M. (2008) Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain–Barré syndrome: New aspects of research. *Biochem Biophys Acta.* **1780**, 441-444.

Lacy M. Q. et al. (1999) Comparison of Interleukin-1 β Expression by In Situ Hybridization on Monoclonal Gammopathy of Underdetermined Significance and Multiple Myeloma. *Blood* **93**, 300-305.

Langmuir A. D., Bregman D. J., Kurland L. T. (1984) An epidemiologic and clinical evaluation of Guillain-Barré Syndrome reported in association with the administration of swine influenza vaccines. *Am. J. Epidemiol.* **119**, 841–879.

Latov N., Renaud S. (2004) Effector mechanism in anti-MAG antibody-mediated and other demyelinating neuropathies. *J. Neurol. Sci.* **220**, 127-129.

Lehmann H., C. Horste G., M., Kieseier B., C., Hartung H-P. (2009) Pathogenesis and treatment of immune-mediated neuropathies. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **4**, 261-281.

Lopez P. H. H. et al. (2011) Myelin-associated glycoprotein protects neuron from excitotoxicity. *J. Neurochem.* **116**, 900-908.

Lopez, P. H. H., Schnaar, R. L. (2009) Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 1–9.

Lunn M. P. T. et al. (2002) Gangliosides and Nogo Receptors Independently Mediate Myelin-associated Glycoprotein Inhibition of Neurite Outgrowth in Different Nerve Cells. *Brain.* **125**, 904-911.

Maisnar V., Hájek R. (2008) Změny v diagnostických kritériích a kritériích léčebné odpovědi u mnohočetného myelomu. *Klin. Biochem. Metab.* **16**, 84-88.

Malíčková K., Janatková I., Šandová P., Zima T. (2007) Protilátky proti glykokonjugátům v diagnostice autoimunitních neuropatií. *Cesk. Slov. Neurol. N.* **6**, 631-636

Matà S., Ambrosini S., Mello T., Lolli F., Minciacchi D. (2011) Anti-myelin associated glycoprotein antibodies recognize HNK-1 epitope on CNS. *J. Neuroimmunol.* **236**, 99-105.

McKhann G. M., Cornblath D. R., Griffin J. W., Ho T. W., Li C. Y., Jiang Z., et al. (1993) Acute motor axonal neuropathy: a frequent cause of acute accid paralysis in China. *Ann. Neurol.* **33**, 333-42.

McMaster M. L., Landgren O. (2010) Prevalence, Clinical Aspects, and Natural History of IgM MGUS. *Cytometry B. Clin. Cytom.* **78**, S91-S97.

Mehta N. R. et al. (2007) Gangliosides and Nogo Receptors Independently Mediate Myelin-associated Glycoprotein Inhibition of Neurite Outgrowth in Different Nerve Cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 27875-27886.

Moran P. M., Annuk H., Prendergast M. M. (2005) Antibodies induced by ganglioside-mimicking *Campylobacter jejuni* liooligosaccharides recognises epitopes at the nodes of Ranvier. *J. Neuroimmunol.* **165**, 179–185.

Nave K. A., Trapp B. D. (2008) Axon-Glial Signaling and the Glial Support of Axon Function. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 535- 561.

Nemni R., Gerosa E., Piccolo G., Merlini G. (1994) Neuropathies associated with monoclonal gammopathies. *Haematologica* **79**, 557-566.

Nguyen T. et al. (2009) Axonal Protective Effects of the Myelin-Associated Glycoprotein. *J. Neurosci.* **29**, 630-637.

Nobile-Orazio E. et al. (2000) Long-term prognosis of neuropathy associated with anti-MAG IgM M-proteins and its relationship to immune therapies. *Brain* **123**, 710-717.

Ogawa G., Kaida Ki., Kusunoki S., Ueda M., Kimura F., Kamakura K. (2009) Antibodies to ganglioside complexes consisting of asialo-GM1 and GQ1b or GT1a in Fisher and Guillain-Barré syndromes. *J. Neuroimmunol.* **214**, 125-127.

Ogawa-Goto K., Abe T. (1998) Gangliosides and glycosphingolipids of peripheral nervous system myelins--a minireview. *Neurochem. Res.* **23**, 305-310.

Otruba P. (2011) Periferní neuropatie – diagnostika a léčba v ordinaci praktického lékaře. *Med. praxi* **6**, 285-287.

Pithadia A. B., Kakadia N. (2010) Guillain-Barré syndrome (GBS). *Pharmacol Rep.* **62**, 220-232.

Pletz M. W.R., Duda P. W., Kappos L., Steck A. J. (2003) Immune-mediated neuropathies: etiology and pathogenic relationship to aging processes. *J. Neuroimmunol.* **137**, 1-11.

Poliak S., Peles E. (2003) The local differentiation of myelinated axons at nodes of ranvier. *Nature.* **4**, 1-14.

Pracovní návod výrobce Bühlmann, GanglioCombi with Enzyme Label Mix IgG/IgM. 2010. Schönenbuch, Švýcarsko

Pracovní návod výrobce Bühlmann, anti-MAG anti-Myelin Associated Glycoprotein Autoantibodies ELISA . 2006. Schönenbuch, Švýcarsko

Quarles R. H. (1997) Glycoprotein of Myelin Sheaths. *J. Mol. Neurosci.* **8**, 1-12.

Quarles R. H. (2002) Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1851-1871.

Quarles R. H. (2007) Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J. Neurochem.* **100**, 1431-1448.

Quarles R. H. (2009) A hypothesis About the Relationship of Myelin-Associated Glycoprotein s Function on Myelinated Axons to its Capacity to Inhibit Neurite Outgrowth. *Neurochem. Res.* **34**, 79-86.

Rajkumar S. V. (2009) Prevention of progression in monoclonal gammopathy of undertermined significance. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5606-5608.

Rajkumar S. V. et al. (2004) Presence of monoclonal free light chains in the serum predicts risk of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br. J. Haematol.* **127**, 308-310.

Rajkumar S. V., Mesa R. A., Fonseca R., et al. (2002) Bone Marrow Angiogenesis in 400 Patients with Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, Multiple Myeloma, and Primary Amyloidosis. *Clin. Cancer Res.* **8**, 2210-2216.

Ramchandren S., Lewis R. A. (2012) An Update on Monoclonal Gammopathy and Neuropathy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **12**, 102-110.

Rossi D. et al. (2007) Hairy cell leukaemia complicated by anti-MAG paraproteinemic demyelinating neuropathy: resolution of neurological syndrome after cladribine treatment. *Leukemia Res.* **31**, 873-876.

Sandecká V., Radocha J., Maisnar V., Hájek R. (2009) MGUS 2010 – výzkumný projekt zaměřený na identifikaci vysoce rizikové prekancerózy. *Klin. Biochem. Metab.* **17**, 75-76.

Sejvar J.J., Baughman A. L., Wise M., Morgan O. W. (2011) Population Incidence of Guillain-Barré Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology.* **36**, 123-133.

Schnaar R. L., Lopez P. H.H. (2009) Myelin-Associated Glycoprotein and Its Axonal Receptors. *J. Neurosci. Res.* **87**, 3267-3276.

Spagnol G., et al. (1998) Expression of glycosylated recombinant human myelin-associated glycoprotein on a neuroblastoma cell line and its reactivity with HNK-1 but not human anti-MAG antibodies. *Neurosci. Lett.* **246**, 157-160.

Steck A. J., Kappos L. (1994) Gangliosides and autoimmune neuropathies: Classification and clinical aspect of autoimmune neuropathies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **57**, 26-28.

Steiner I., Rosenberg G., Wirguin I. (2010) Transient immunosuppression: a bridge between infection and the atypical autoimmunity of Guillain–Barré syndrome?. *Clin. Exp. Immunol.* **162**, 32-40.

Stubbs E. B. Jr et al. (2003) Anti-neurofilament antibodies in neuropathy with monoclonal gammopathy of undetermined significance produce experimental motor nerve conduction block. *Acta Neuropathol.* **105**, 109-116.

Svennerholm L., (1964) Gangliosides. *J. Lipid Res.* **5**, 145-155.

Ščudla V., Pika T. (2009) Monoklonální gamapatie nejistého významu ve světle současných poznatků. *Klin. Biochem. Metab.* **17**, 62-71.

Ščudla V., Pika T., Heřmanová Z. (2010) Hevylite – nová analytická metoda v diagnostice a hodnocení průběhu monoklonálních gamapatií. *Klin. Biochem. Metab.* **18**, 62-68.

The International Myeloma Working Group. (2003) Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br. J. Haematol.* **121**, 749-757.

Vinson M., et al. (2003) Lipid rafts mediates the interaction between myelin-associated glycoprotein (MAG) on myelin and MAG-receptors on neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **22**, 344-352.

Van der Meché, F. G. A., Schmitz P. I. M., Dutch Guillain-Barre Study Group (1992) A randomized trial comparing intravenous immune globulin and plasma exchange in Guillain- Barre syndrome. *New Engl. J. Med.* **326**, 1123–1129.

Van Doorn P. A., Ruts L., Jacobs B. C. (2008) Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barré syndrome. *Lancet Neurol* **7**, 939-950.

Willison H. J., Yuki N. (2002) Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain* **125**, 2591-2625.

Willison H.J. (2005) The immunobiology of Guillain-Barre syndromes. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **10**, 94-112.

Yin X. et al. (1998) Myelin-Associated Glycoprotein Is a Myelin Signal that Modulates the Caliber of Myelinated Axons. *J. Neurosci.* **6**, 1953-1962.

Yiu G., He Z. (2006) Glial inhibition of CNS axon Regeneration. *Nature.* **7**, 617- 627.

Yu R. K., Usuki S., Ariga T. (2006) Ganglioside Molecular Mimicry and Its Pathological Roles in Guillain-Barré Syndrome and Related Diseases. *Infect. Immun.* **74**, 6517-6527.

Yuki N. (1997) Molecular Mimicry between Gangliosides and Lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* Isolated from Patients with Guillain-Barré Syndrome and Miller Fisher Syndrome. *J. Infect. Dis.* **176**, S150-153.

Yuki N. (1998) Anti-ganglioside antibody and neuropathy: review of our research. *J Peripher Nerv Syst.* **3**, 3-18.

Yuki N., Kuwabara S., Koga M., Hirata K. (1999) Acute motor axonal neuropathy and acute motor-sensory axonal neuropathy share a common immunological profile. *J Neurol Sci.* **168**, 121-6.

Yuki N. (2005) Carbohydrate mimicry: a new paradigm of autoimmune diseases. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 577-582.

Živkovič S. A., Lacomis D., Lentzsch S. (2009) Paraproteinemic neuropathy. *Leukemia & Lymphoma*. **50**, 1422-1433.

7.1 Seznam hypertextových odkazů

internetový zdroj: (internet 1) staženo dne: 24.11. 2012

<http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/autoimunitni-onemocneni-410724>

internetový zdroj: (internet 2) staženo dne 24. 11. 2012

http://www.medicina.cz/odborne/clanek.dss?s_id=4729

internetový zdroj: (internet 3) staženo dne 15.1. 2013

<http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/periferni-neuropatie-387155>

internetový zdroj: (internet 4) staženo dne 20.1. 2013

<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/polyneuropatie-285064>

internetový zdroj: (internet 5) staženo dne 4.2. 2013

http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&termId=1393&tname=Polyneuropatie+autoimunitn%C3%AD

internetový zdroj: (internet 6) staženo dne 4.2. 2013

<http://www.focusdx.com/focus/techsheets/Neuropathy-associatedAntibodyTestingatMRL.pdf>

internetový zdroj: (internet 7) staženo dne 4. 2. 2013

<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/monoklonalni-gamapatie-obecne-a-monoklonalni-gamapatie-nejisteho-vyznamu-drivejsim-terminem-benigni-gamapatie-457917>

internetový zdroj: (internet 8) staženo dne 5.2. 2013

http://www.isno.nl/Neuromuscular_Info/Disorders_and_diagnostics/Disorders/Items/Polynuropathy_associated_with_monoclonal_gammopathy/Default.aspx

internetový zdroj: (internet 9) staženo dne 10.2. 2013

<http://www.buhlmannlabs.ch/files/documents/core/Neuroimmunologie/corporate/neuroimmunologiecf017ml-06e.pdf>

internetový zdroj: (internet 10) staženo dne 13.2. 2013

http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/imch/10_EIA.pdf

internetový zdroj: (internet 11) staženo dne 13.2.2013

<http://www.genwaybio.com/services/elisa>

internetový zdroj: (internet 12) staženo den 13.2. 2013

http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/elisa.html

internetový zdroj: (internet 13) staženo dne 13.2. 2013

<http://che1.lf1.cuni.cz/html/imuno.pdf>

internetový zdroj: (internet 14) staženo dne 6.4. 2013

<http://www.childrenshospital.org/az/Site974/mainpageS974P0.html>

8 Seznam zkratek

AIDP	akutní zánětlivá demyelinizující polyradikuloneuropatie (acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy)
ALS	amyotrofická laterální skleróza
AMAN	akutní motorická axonální neuropatie
AMSAN	akutní senzitivně-motorická axonální neuropatie
BTU	Bühlmann Titre Unit
CIDP	chronická zánětlivá demyelinizační polyneuropatie (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
CT	počítačová tomografie (computed tomography)
CNS	centrální nervová soustava
GBS	Guillan-Barré syndrom
HDIVIG	vysoká dávka intravenózních imunoglobulinů (high-dose intravenous immunoglobulin)
HNK-1	human natural killer- 1
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
LOS	lipo-oligosacharidy
MAG	glykoprotein asociovaný s myelinem (myelin associated glycoprotein)
MFS	Miller Fisherův syndrom
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu (monoclonal gammopathy undertermined significance)
MM	mnohočetný myelom
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)
NK	natural killer
PNS	periferní nervová soustava
POEMS	Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy/ Edema syndrom
TMB	tetramethylbenzidin
UV	ultrafialové záření