



**Biologické a klinické markery poškození nervové soustavy u
neurodegenerativních onemocnění**

Analýza mozkomíšního moku u pacientů s Parkinsonovou nemocí

Disertační práce

Obor Neurologie

MUDr. Hana Přikrylová Vranová

Autorské prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

V Olomouci dne 15.9. 2011

MUDr. Hana Přikrylová Vranová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala všem kolegům z Neurologické kliniky, kteří mi pomohli k získání dat zpracovaných v této práci, jmenovitě Doc.MUDr. Janu Marešovi, Ph.D., který mě dovedl k samotné likvorové analýze a prof. MUDr. Ing. Petru Hlušíkovi, Ph.D., který mi pomáhal svými četnými připomínkami při zpracování textu v publikacích. V neposlední řadě patří můj dík Mgr. Janě Zapletalové, Dr., která mi pomohla se statistickým zpracováním všech dat.

Obsah

1 Úvod.....	6
1.1 Úvod do problematiky neurodegenerativních onemocnění.....	6
1.1.1 Etiopatogeneze neurodegenerativních onemocnění.....	7
1.1.2 Klasifikace neurodegenerativních onemocnění.....	8
1.1.2.1 Onemocnění s hromaděním beta-amyloidu – amyloidopatie.....	9
1.1.2.1.1 Alzheimerova demence (AD).....	10
1.1.2.2 Tauopatie.....	11
1.1.2.2.1 Progresivní supranukleární paralýza (PSP).....	13
1.1.2.2.2 Kortikobazální degenerace.....	15
1.1.2.3 Alfa-synukleinopatie.....	15
1.1.2.3.1 Parkinsonova nemoc.....	16
1.1.2.3.2 Multisystémová atrofie (MSA).....	17
1.1.2.3.3 Demence s Lewyho tělísky (DLB).....	18
1.1.2.4 Polyglutaminová onemocnění.....	19
1.2 Parkinsonova nemoc.....	20
1.2.1 Úvod.....	20
1.2.2 Etiopatogeneze.....	20
1.2.2.1 Mitochondriální dysfunkce a narůstající oxidativní stres.....	20
1.2.2.2 Narušení proteinové degradace.....	21
1.2.2.3 Agregace proteinů a Lewyho tělíska.....	22
1.2.2.4 Zánět a aktivace glíí.....	23
1.2.2.5 Apoptóza a buněčná smrt.....	24
1.2.3 Neuropatologie.....	26
1.2.4 Patofyziologie.....	27
1.2.5 Klinický obraz.....	27
1.2.5.1 Základní projevy.....	28
1.2.5.2 Přídavné projevy.....	29
1.2.5.3 Komplikace pokročilého stádia.....	30
1.2.6 Formy Parkinsonovy nemoci.....	31
1.2.7 Diagnostika.....	33
1.2.8 Diferenciální diagnóza.....	35
1.2.9 Terapie.....	37
1.2.9.1 Farmakoterapie Parkinsonovy nemoci.....	38
1.2.9.2 Neurochirurgická léčba Parkinsonovy nemoci.....	39
1.2.9.3 Rehabilitace.....	39

1.3 Vyšetření mozkomíšního moku u neurodegenerativních onemocnění.....	40
1.3.1 Úvod.....	40
1.3.2 Možnosti vyšetření mozkomíšního moku u neurodegenerativních onemocnění.....	41
1.3.3 Proteiny asociované s Alzheimerovou demencí ve vztahu k Parkinsonově nemoci.....	42
2 Vyšetření likvorových markerů neurodegenerace u Parkinsonovy nemoci.....	44
2.1 Laboratorní ukazatele neurodegenerace v likvoru a míra motorického postižení u Parkinsonovy nemoci: korelační studie.....	45
2.2 Likvorové markery neurodegenerace u Parkinsonovy nemoci.....	52
2.3 Hladiny tau proteinu a beta-amyloidu 1-42 v likvoru u jednotlivých klinických subtypů Parkinsonovy nemoci.....	59
3 Diskuze.....	71
4 Závěr.....	76
5 Souhrn	78
5.1 Souhrn	78
5.2 Summary.....	80
6 Literatura.....	82
7 Publikace.....	93
7.1 Publikace související s prací.....	93
7.1.1 Publikace uveřejněné in extenso v recenzovaných časopisech s IF.....	93
7.1.2 Publikace uveřejněné in extenso v ostatních recenzovaných časopisech	94
7.1.3 Publikovaná abstrakta.....	94
7.1.4 Seznam přednášek/posterů přednesených na veřejných odborných fórech.....	96
7.2 Ostatní publikace.....	98
7.2.1 Publikace uveřejněné in extenso v recenzovaných časopisech s IF.....	98
7.2.2 Publikovaná abstrakta.....	99
8. Přílohy.....	101

1. Úvod

Tématem postgraduálního studia byla komplexní analýza markerů postižení centrální nervové soustavy u neurodegenerativních onemocnění. Vzhledem k množství dat získávaných již od počátku výzkumu, byla však samotná disertační práce zaměřena pouze na analýzu mozkomíšního moku.

Na počátku práce je uveden stručný úvod do problematiky neurodegenerativních onemocnění s důrazem na jejich etiopatogenezi. Dále jsou zde zpracovány možnosti vyšetření mozkomíšního moku u těchto afekcí.

V dalším textu jsou prezentovány výsledky samotného výzkumu, který je rozdělen do dvou částí. V první části se zabývá vyšetřením mozkomíšního moku u pacientů s Parkinsonovou nemocí a jejich korelací s délkou trvání nemoci a tíží motorického postižení. V druhé části je uvedena analýza mozkomíšního moku u pacientů s Parkinsonovou nemocí, kteří jsou rozdělení do jednotlivých klinických subtypů.

Parkinsonova nemoc je jedno z nejčastěji diagnostikovaných neurodegenerativních onemocnění a z celé plejády těchto nemocí je také asi nejpřesněji diagnostikována. Dosud ale není zcela jasná dynamika neurodegenerativního procesu a ani není znám ukazatel, který by vyjadřoval tíž či intenzitu neurodegenerace. Předkládaná práce má za cíl ukázat, že vyšetření určitých markerů v mozkomíšním moku by mohlo být na tomto poli přínosné.

1.1 Úvod do problematiky neurodegenerativních onemocnění

Neurodegenerativní onemocnění (ND) jsou široká skupina chorob centrálního nervového systému, která je způsobena předčasným zánikem nebo degenerací nervových buněk.

V současné době patří mezi jedny ze zdravotně a sociálně-ekonomicky nejzávažnějších. Problematika tkví zejména v jejich obtížné diagnostice, limitované terapii a rapidní progresi. Často tato onemocnění navíc postihují osoby v produktivním věku, přichází velmi náhle a díky nízké informovanosti laické veřejnosti jsou tyto diagnózy velmi obtížně chápány.

1.1.1 Etiopatogeneze neurodegenerativních onemocnění

Jedná se o velmi heterogenní skupinu chorob, které je obtížné zařadit či roztrždit do jednotlivých podskupin. Jednou z možností se jeví třídění onemocnění podle převažujících patogenetických dějů. I přes dosti výraznou odlišnost mají neurodegenerace některé společné základní vlastnosti. Jsou to stavy, při kterých dochází k úbytku specifických skupin neuronů, jejichž výsledkem je selektivní postižení určité neuronální subpopulace a následný klinický obraz daného onemocnění.

V současnosti převládá názor, že ND jsou způsobeny kombinací několika hlavních patogenetických vlivů, jejichž podíl se u jednotlivých onemocnění může lišit (van Dijk et al.2010). Jsou to:

1. apoptóza
2. mitochondriální dysfunkce a oxidativní stres
3. abnormální degradace a následná agregace patologicky změněných proteinů
4. zánět a aktivace glií
5. genetické pozadí

ad 1.) K apoptóze, neboli programované buněčné smrti dochází, když souhrou vnějších a vnitřních spouštěcích mechanismů dojde k interakci pro- a anti-apoptotických faktorů spouštějících nezadržitelnou kaskádovou reakci, která vede k zániku postižené buňky (Barzilai 2010; Yasuda et al.2010).

ad 2.) Mitochondriální dysfunkce a narůstající oxidativní stres souvisí s přítomností volných kyslíkových radikálů, jejichž největším producentem jsou právě mitochondrie. Působení volných kyslíkových radikálů je dáno kombinací zvýšené produkce nebo nedostatečnou inhibicí jejich působení v důsledku postižení enzymatické buněčné výbavy (Wang et al.2011; Higgins et al.2010).

ad 3.) Produkci změněných, zmutovaných, denaturovaných či jinak poškozených proteinů a jejich zhoršená degradace má za následek akumulaci a agregaci těchto proteinů do formací, typických pro jednotlivá onemocnění (Williams 2006; Martinez et al.2010).

ad 4.) Je zvažováno, že zánětlivé změny s aktivací glií přispívají ke kaskádě událostí vedoucích k neurodegeneraci a tudíž k progresi onemocnění (Hirsch a Hunot 2009; DeLegge et al.2008; Li et al.2011). Nicméně i samotný zánět může být odpovědný za neurodegenerativní proces.

ad 5.) Kombinace těchto faktorů spolu s genetickým pozadím jsou zřejmě příčinou vzniku neurodegenerativních onemocnění.

1.1.2 Klasifikace neurodegenerativních onemocnění

Jak již bylo zmíněno, ND jsou heterogenní skupinou onemocnění. V literárních zdrojích existuje řada klasifikací, které se od sebe liší. Jedno z možných dělení vychází z poznatků molekulárních neuropatologických studií. Tyto studie ukázaly, že klíčovým prvkem mechanismu vzniku neurodegenerativního onemocnění je obvykle nadprodukce normální bílkoviny nebo tvorba aberantního proteinu s nestabilní strukturou a s tendencí k tvorbě intra- nebo extracelulárních bílkovinných shluků, které pak interferují s normální funkcí a mohou souviset se zánikem neuronů v postižené části mozku (Bednařík et al.2010).
Dělí se na:

1. Onemocnění s hromaděním beta-amyloidu – amyloidopatie
2. Tauopatie
3. Alfa-synukleinopatie
4. Polyglutaminová onemocnění

1.1.2.1 Onemocnění s hromaděním beta-amyloidu - amyloidopatie

Hlavním zástupcem těchto onemocnění je **Alzheimerova demence (AD)**. V neuronech je přítomna přirozená bílkovina amyloidový prekurzorový protein (APP), který se vyskytuje v různých částech buněk, nejvíce v transmembránové frakci. APP je odbouráván dvěma možnými cestami. Štěpením enzymem alfa-sekretázou vznikají neškodné rozpustné peptidové fragmenty o délce do 39-40 aminokyselin, které mají své fyziologické role. Za patologických podmínek dochází ke štěpení APP beta-sekretázou a následně gama-sekretázou, které dávají vzniknout delším fragmentům o 42 a 43 aminokyselinách, ty přestávají být solubilní, srážejí se v extracelulárních prostorech a polymerují. Ty se pak stávají jádrem tzv. alzheimerovských amyloidních či neuritických plak. V místě plak pak dochází k zániku synapsí, degenerativním změnám až k postupnému zániku neuronů. Současně dochází k aktivaci glií a ke sterilní zánětlivé reakci včetně aktivace cyklooxygenázy-2, což vede k uvolnění dalších látek, jako jsou volné kyslíkové radikály, cytokiny a další. Plaky tvořené beta-amyloidem jsou nalézány i u jiných onemocnění jako demence s Lewyho tělísky, či demence u Parkinsonovy nemoci. Ukládání beta-amyloidu na výstelce mozkových cév je podkladem cerebrální amyloidové angiopatie (Blenow et al. 2006).

1.1.2.1.1 Alzheimerova demence (AD)

AD je nejčastější ze všech demencí s odhadovanou četností kolem 60% ze všech demencí, častěji se vyskytuje u žen a u lidí s nižším vzděláním.

Nejdůležitějším příznakem je ztráta paměti - vstřípivosti i výbavnosti - a některých dalších kognitivních schopností (zejména poruchy řeči, apraxie, poruchy prostorových funkcí). Horšení je dlouhodobé a progresivní, dochází k negativnímu dopadu na běžné každodenní aktivity. Podmínkou je vyloučení jiných onemocnění, které mohou narušit kognici. Častou komplikací jsou poruchy chování a nálady (deprese, podrážděnost, nespavost, halucinace, anorexie). Diagnóza je kombinací určitých charakteristických příznaků (zahrnují vždy postižení paměti a alespoň jedné další složky kognice, které by měly být potvrzeny neuropsychologickými testy) a vylučovacích kritérií (je nutno vyloučit např. depresi, hydrocefalus, tumory, těžké vaskulární postižení mozku nebo jiné demence).

Přítomnost acetylcholinu v CNS je významná pro správné fungování paměti a učení. U pacientů s AD je pozorován úbytek cholinergních neuronů v nucleus basalis Meynerti s následným nedostatkem acetylcholinu především v temporálních a parietálních oblastech (Bednařík et al. 2010).

Hlavními rizikovými faktory AD jsou věk, rodinný výskyt demence a apoE4 (Leoni 2011). Kromě sporadických forem AD existují i formy hereditární. Ty se manifestují jako AD s časným začátkem a jsou vázány na mutace APP a presenilinů (PS), což jsou kofaktory patologického beta-amyloidového štěpení APP. Tyto formy jsou relativně vzácné, převažuje autozomálně dominantní typ přenosu s vysokým stupněm penetrace.

Apolipoprotein E (ApoE) hraje významnou roli v lipidovém metabolismu. Je syntetizován především v játrech, v menší míře ale i přímo v mozku, přičemž existuje polymorfismus ApoE. Výskyt alel ApoE ϵ 4 je spojen s prokázaným vyšším rizikem vzniku AD, naproti tomu forma ϵ 2 by mohla být protektivní. Nicméně zdaleka ne všichni homozygoti ApoE ϵ 4 onemocní AD a proto jeho stanovování není vhodným ani doporučeným diagnostickým testem pro časnou AD (Leoni 2011).

V současné době se v diagnostice uplatňuje neuropsychologické vyšetření, které prokazuje kognitivní deficit a pomocná zobrazovací vyšetření CT a MRI mozku ukazující atrofii převážně v temporální oblasti. Pomocným se jeví i vyšetření neurodegenerativních markerů v mozkomíšního moku, kde je častým nálezem zvýšení hladiny tau-proteinu, snížení beta-amyloidu₁₋₄₂ a zvýšení indexu tau/beta.

V terapii AD se v současné době uplatňují inhibitory acetylcholinesterázy (donepezil, rivastigmin, galantamin) a nekompetitivní antagonisty glutamátových NMDA receptorů (memantin).

1.1.2.2 Tauopatie

Tau protein je jeden z několika typů MAPs („microtubule-associated proteins“), které se podílejí na tvorbě a stabilitě sítě mikrotubulů. Nachází se převážně v axonech, kde tvoří částečně stabilní, ale stále dynamický stav v mikrotubulární síti, který je důležitý pro růst axonu a efektivní axonální transport živin a dalších látek uvnitř neuronu. Onemocnění, při kterých je v mozkové tkáni prokázána přítomnost akumulovaného insolubilního tau proteinu jsou označována jako tauopatie. Dosud není známa příčina, která vede u těchto onemocnění k rozvoji neurodegenerace a agregace tau proteinu, navíc není zcela jasné, zda agregáty tau proteinu jsou podkladem neurodegenerace, či jsou produktem obranných mechanismů (Williams 2006). Tau protein je kódován MAPT genem na 17. chromozomu a v mozku dospělého člověka se vyskytuje v šesti izoformách (Neve et al.1986). Na tau proteinu rozlišujeme C-konec, který se váže na mikrotubuly a N-konec, který vyčnívá z povrchu mikrotubulů a umožňuje vazbu na jiné buněčné komponenty jako je cytoplazmatická membrána. Jednotlivé izoformy se mezi sebou liší obzvláště přítomností třech nebo čtyř vazebných míst na C-konci, který právě zajišťuje vazbu na mikrotubuly (Lee et al.1989). Tři izoformy obsahují po třech vazebných sekvencích a tři izoformy po čtyřech vazebných

sekvencích. Tau se čtyřmi vazebnými sekvencemi tvoří pevnější vazbu s mikrotubuly oproti trojvazebnému tau proteinu, dokonce může vytěsnit již dříve navázaný trojvazebný tau protein (Lu et al.2001). V mozkové kůře dospělého člověka je poměr troj- a čtyřvazebné izoformy tau proteinu vyrovnaný, což je zřejmě podkladem jeho normální funkce. Fosforylace určitých zbytků uvnitř opakujících se okrsků narušuje interakci mezi tau proteinem a mikrotubuly a vede k odloučení tau proteinu (Drewes et al.1995). N-konec vyčnívající z povrchu mikrotubulů, označovaný jako projekční doména, zahrnuje mimo jiné úsek bohatý na aminokyselinu prolin, který obsahuje tzv. PXXP motiv. Zvažuje se, že tato projekční doména vymezuje prostor mezi mikrotubuly a může hrát roli v interakcích mezi tau proteinem a jinými proteiny tvořících cytoskelet (Chen et al.1992). O PXXP motivu je známo, že interaguje s proteiny, které jsou obsaženy v SH3 doméně (Src homology 3 domain), která se podílí na regulaci buněčného chování a hraje důležitou roli v řadě onemocnění. SH3 např. obsahuje tyrozin-kinázu Fyn, která katalyzuje fosforylaci na tyrozin a spolupracuje s tau proteinem na produkci myelinových obalů.

Mutace genu pro tau protein narušuje vzájemný poměr mezi jednotlivými izoformami tau proteinu, zhoršuje vazebnou schopnost tau proteinu (Hong et al.1998) a usnadňuje agregaci tau protein do nerozpustných filament (Nacharaju a kol 1999). Na základě tohoto se předpokládá, že neurodegenerace vázaná s tau patologií je způsobena kombinací toxicity vzniklé při abnormalitách tau proteinu a zároveň ztrátou jeho fyziologické funkce. Samotný mechanismus, který vede či přispívá k abnormitám tau proteinu způsobující zánik neuronů však dosud není přesně znám.

Mutace MAPT genu způsobuje onemocnění frontotemporální demence - parkinsonismus s vazbou na chromozom 17 (FTDP-17) (Hutton et al.1998). Podobným fenotypem a nálezy abnormálního tau proteinu jsou mezi tauopatie řazena i některá sporadická neurodegenerativní onemocnění jako je např. AD, progresivní supranukleární paralýza, kortikobazální syndrom, frontotemporální demence aj., u kterých je však v některých případech také prokázána tzv. missense mutation (záměna jednoho

aminokyselinového zbytku za druhý) v MAPT genu (Delisle et al.1999; Bugiani et al.1999; Poorkaj et al.2002).

U těchto onemocnění dochází k narušení vazebných míst tau proteinu, což vede k poruchám struktury a stability mikrotubulů s následným negativním vlivem na důležité buněčné procesy. Mění se i poměr mezi jednotlivými izoformami tau proteinu ve prospěch čtyřvazebné izoformy. Normálně se solubilní tau protein nachází pouze v axonech, ale u tauopatií se změněný tau protein nachází i v tělech neuronů, dendritech a gliích. Tento volný pozměněný tau protein nenavázaný na tubuly má větší tendenci k hyperfosforylaci, přeměně ve vláknité formy a ke shlukování. Výsledkem je vznik intracelulárních inkluzí, tzv. neurofibrilárních klubek, která jsou nacházená v mozcích pacientů s výše uvedenými chorobami (Goedert 2004).

1.1.2.2.1 Progresivní supranukleární paralýza (PSP)

PSP (nemoc Steelova-Richardsonova-Olszewskiho) byla poprvé definována v roce 1963 jako progresivní neurodegenerativní onemocnění, manifestující se kombinací parkinsonského syndromu, kognitivního deficitu a supranukleární okohybné poruchy. Typické pro toto onemocnění je dále rozvoj pádů, dysartrie a dysfagie již od časných stádií onemocnění. Prevalence PSP je kolem 5 případů na 100 000 obyvatel bez rozdílu výskytu mezi muži a ženami, typický počátek onemocnění je mezi 50. a 70. lety. U PSP dochází k abnormální agregaci hyperfosforylovaného tau proteinu zvl. v oblasti substantia nigra, nucleus subthalamicus a mezencefala (Williams et al. 2008). Klinický obraz PSP je tvořen symetrickým parkinsonským syndromem, obvykle bez třesu, typické je dále hyperextenzní držení trupu a šíje. Již v časných stádiích onemocnění bývá nápadná posturální instabilita, která často vede k pádům. Charakteristická pro PSP je porucha okulomotoriky typicky s parézou pohledu bulbů směrem dolů. Nejprve však může být patrné jen zpomalení a hypometrie sakadovaných pohybů či nestabilní fixace, v pozdějších stádiích se ale obvykle postupně rozvine typická supranukleární paréza vertikálních pohledů. V plně rozvinuté formě

PSP pak dochází ke kombinaci parézy vertikálních a horizontálních sledovacích pohybů a omezením mrkání, jejichž výsledkem je typický výraz obličeje s vyděšenýma očima bez sledovacích pohybů. Současně bývá přítomna šeptavá drmolivá řeč, která je projevem těžké dysartrie a dysfonie. U PSP je přítomen i kognitivní deficit, který se projevuje nejprve zpomalením psychomotorického tempa s postupnou progresí do demence frontálního typu.

Na základě recentních klinicko-patologických studií bylo navrženo dělení PSP na dva hlavní fenotypové subtypy, tzv. „typickou PSP“ a „atypickou PSP“ (Williams et al.2005):

- „typická PSP“ - Richardsonův syndrom – tvoří přes 50% verifikovaných případů PSP, ve 2/3 případů jsou postiženi muži, klinický obraz odpovídá výše zmíněnému popisu, je charakterizován rychlejší progresí onemocnění s průměrným přežitím kolem 5 let od rozvoje prvních příznaků, vzhledem k rychlejší progresi je i dříve diagnostikován, bývá přítomen časný rozvoj posturální instability a pádů, supranukleární parézy pohledu a výraznější neuropsychologický a neurobehaviorální deficit (Srluijes et al.2011).

- „atypická PSP“ - PSP – parkinsonismus (PSP-P) tvoří kolem 35% případů, vyskytuje se se stejnou četností u obou pohlaví, klinickým obrazem připomíná Parkinsonovu nemoc. Zpočátku může být vyjádřena stranová asymetrie, třes a alespoň přechodná odpovídavost na dopaminergní terapii. Průběh onemocnění je pomalejší, průměrná doba přežití je asi 9 let od rozvoje prvních klinických příznaků (Williams et al.2005).

Na základě dalšího klinicko-patologického sledování Williamse et al.z roku 2007 byla navržena třetí varianta klinické manifestace PSP - „čistá akineze se zárazy chůze“ (pure akinesia with gait freezing – PAGF). Tento subtyp PSP je vzácný a tvoří zbylou část asi 15% ze všech patologicky verifikovaných PSP. Vedoucími příznaky jsou zárazy při startu a v průběhu chůze, až po čase se k těmto příznakům mohou přidat další typické projevy pro PSP.

Diagnóza PSP je stanovena zvl. na podkladě klinického obrazu, může k ní však přispět i MR mozku, kde je v typických případech popisován nález v sagitálních projekcích mozkového kmene přirovnávaný k obrazu kolibříka či tučňáka, dále se popisuje atrofie mozečkových pedunklů a zvýšený signál v mezencefalu, ncl. ruber a v pallidu.

1.1.2.2.2 Kortikobazální syndrom

Kortikobazální syndrom (CBS), dříve kortikobazální degenerace (corticobasal ganglionic degeneration – CBGD) je sporadické onemocnění s typickým výskytem kolem 60. až 70. roku. Vyskytuje se vzácněji než MSA či PSP a rovnoměrně postihuje ženy i muže. Průměrná doba přežití je kolem 8 let od počátku prvních klinických příznaků.

Klinický obraz je tvořen asymetrickým parkinsonským syndromem, dystonií či myoklonem na postižené končetině, bývá vyjádřen příznak „odcizené končetiny“ („alien hand“), apraxie, kognitivní deficit s kombinací známek typických pro frontální exekutivní dyfunkce a postižení parietálního laloku dosahující až stupně demence (Wadia et al. 2007).

Patologicky se CBS vyznačuje difúzními depozity patologického hyperfosforylovaného čtyřvazebného tau proteinu v mozku a neuronální degenerací substantia nigra a frontoparietální kůry (Ling et al. 2010).

Diagnostika CBS je velmi obtížná, je založena na klinickém obraze a může napomoci MR zobrazení mozku, kde bývá nález asymetrické kortikální atrofie v souladu s klinickým postižením.

1.1.2.3 Alfa-synukleinopatie

Alfa-synuklein se za normálních podmínek podílí na synaptické plasticitě. Koncentrace alfa-synukleinu je v mozku poměrně vysoká a v kombinaci s jeho schopností reagovat s mnoha jinými bílkovinami, se vysvětluje jeho spoluúčast na patogenezi různých neurodegenerativních procesů, jejichž součástí je agregace proteinů. Pravidelnou součástí vznikajících inkluzí bývají ubikvitin a komponenty proteázového komplexu. V důsledku

mutace genu pro alfa-synuklein dochází k tvorbě defektní bílkoviny s tendencí k oxidativnímu poškození, oligomeraci a k agregaci, což je popisováno u jedné z forem (PARK-1) familiární Parkinsonovy nemoci (PN). Uvažuje se, že jeho nepravidelná šroubovitá struktura má i za normálních okolností tendenci ke shlukování do nesvinutých tvarů a tudíž i normální nezmutovaný alfa-synuklein může hrát patogenní roli. V prostředí dopaminergních buněk substantia nigra podporuje agregaci alfa-synukleinu oxidativní stres a přítomnost reaktivních forem železa. Takto vzniklé alfa-synukleinové fibrily se hromadí v Lewyho tělíscích, jež se považují za typickou neuropatologickou známku zániku neuronů i u sporadických forem PN. Lewyho tělíska mohou být ovšem ve skutečnosti projevem protektivních mechanismů a označovat přežívající neurony, zatímco zaniklým buňkám se nepodařilo alfa-synukleinové fibrily shromáždit a zneškodnit. Hromadění alfa-synukleinu a jeho fragmentů v patologických intracerebrálních inkluzích není výhradním nálezem u PN. Nachází se i u jiných neurodegenerativních onemocnění, jako u demence s Lewyho tělísky, v amyloidních plakách u AD, u Downova syndromu a v gliálních cytoplazmatických inkluzích u multisystémové atrofie (Růžička et al.2000).

1.1.2.3.1 Parkinsonova nemoc (PN)

Parkinsonova nemoc je progresivní neurodegenerativní onemocnění způsobené převážně ztrátou dopaminergních buněk substantia nigra. Je pojmenována podle Jamese Parkinsona, anglického lékaře, který ji poprvé popsal v „An Essay on the Shaking Palsy“ v roce 1817. Parkinsonova nemoc je považována za jedno z nejčastějších neurologických onemocnění, postihuje až 1% populace starší 60 let. Hlavní příznaky zahrnují třes, rigiditu, bradykinezu a posturální instabilitu.

Blíže viz kap. 1.2

1.1.2.3.2 Multisystémová atrofie (MSA)

MSA je progresivní neurodegenerativní onemocnění se sporadickým výskytem, patřící do skupiny synukleinopatií. MSA je charakterizována různou kombinací autonomní dysfunkce, parkinsonismu se špatnou odpovídností na terapii L-DOPA, mozečkovou ataxií, dysfunkcí urogenitálního systému a pyramidovými příznaky. Průběh onemocnění je poměrně rychle progredující, průměrná doba přežití od rozvoje prvních příznaků je mezi 7 a 9 lety. MSA začíná průměrně ve věku 60 let, stejně často bývají postižení muži i ženy (Stefanova et al.2009). Prevalence MSA je mezi 1,9 a 4,9/100 000 obyvatel (Wenning et al.2004).

Na základě klinické manifestace můžeme rozlišit formu parkinsonskou s převažujícím extrapyramidovým postižením (MSA-P) a formu mozečkovou s převažujícím postižením mozečku (MSA-C) (Gilman et al.2008). Dle práce Gesera et al.z roku 2006, tvoří MSA-P přibližně 58% všech pacientů s MSA, MSA-C je zastoupena ve zbylých 42%.

Parkinsonské projevy u pacientů s MSA probíhají většinou pod obrazem bradykineze, rigidity, posturální instability a dysartrie. Třes může být přítomen, nemívá však charakter klidového tremoru typického pro Parkinsonovu nemoc, spíše bývá posturální či intenční, často asymetrický a někdy i s myokloniemi. Odpověď na léčbu levodopou bývá velmi omezená. Progrese parkinsonského syndromu u MSA-P je většinou rychlejší než u PN (May et al.2007). Hlavním mozečkovým postižením u MSA jsou poruchy chůze a stability, může být hypermetrie, dysmetrie, intenční tremor či poruchy okulomotoriky s hypermetrickými sakádami, může být přítomna i mozečková dysartrie se skandovanou řečí. Pyramidová dysfunkce se většinou omezuje na hyperreflexii a Babinského příznak. Typická pro MSA je přítomnost dysautonomie a výskyt sfinkterových obtíží. Již od počátku onemocnění bývá výrazná posturální instabilita, vedoucí až k pádům, v některých případech ale může být i chybět. Inkontinence, imperativní mikce a poruchy potence mohou dotvářet klinický obraz MSA.

Často lze prokázat postižení frontálních exekutivních funkcí, spíše mírného stupně, naproti tomu plně vyvinutá demence nepatří do typického obrazu MSA. Pro diagnostiku MSA

je z pomocných vyšetřovacích metod nejvýznamnější ortostatický test, kdy je pokles systolického TK o 30 torrů a/nebo diastolického TK o 15 torrů (zvláště bez reaktivního vzestupu tepové frekvence) po 3 minutách postavení z polohy vleže svědčí pro poruchu autonomního nervového systému. Z dalších pomocných vyšetřovacích metod je pro diagnostiku užitečná MRI s relativně častým nálezem atrofie mozečku a brachia pontis, někdy lze najít i snížení signálu putamen v T2 vážených sekvencích. Definitivní diagnóza MSA je stanovena na základě neuropatologického průkazu argyrofilních gliálních cytoplasmatických inkluzí v asociaci se striatonigrální degenerací nebo olivopontocerebelární ataxií (Trojanowski et al. 2007).

1.1.2.3.3 Demence s Lewyho tělísky (DLB)

DLB je sporadické onemocnění, vyznačující se koincidencí parkinsonského syndromu a demence subkortikálního typu s charakteristickými fluktuacemi kognitivní poruchy a psychotickými projevy. Jedná se o druhou nejčastější degenerativní demenci po Alzheimerově nemoci s odhadovanou četností 7 až 15% ze všech demencí. Vyskytuje se nejčastěji kolem 70. roku věku a průměrné přežití je 5 let.

Klinicky se projevuje od počátku současně se rozvíjejícím kognitivním deficitem a parkinsonským syndromem bez třesu, obvykle s neúplnou odpovědí na dopaminergní terapii. Demence je převážně frontálního typu, bývají přítomny zrakové či sluchové halucinace a výrazně kolísavý průběh. Významné postižení paměti se nemusí vždy vyskytovat v počátečních stádiích onemocnění, ale v průběhu choroby bývá výrazné. Mohou být přítomny i další projevy, jako jsou opakované pády, synkopy, přechodné poruchy vědomí a/nebo systematizované bludy. Častá je apatie, poruchy nálady a deprese (Mollenhauer et al. 2010). Diagnóza je založena na klinickém obraze, k vyloučení strukturálních příčin má význam CT a MR mozku.

1.1.2.4 Polyglutaminová onemocnění

Genová expanze nestabilních nukleotidových sekvencí se považuje za unikátní mechanismus lidské patologie. Pro vznik neurodegenerativních onemocnění má význam zejména expanze trinukleotidové sekvence CAG, která v případě přepisu do bílkovinné molekuly vede k tvorbě prodloužených polyglutaminových řetězců. Toxické působení polyglutaminů se vysvětluje jejich tendencí ke shlukování, především k tvorbě intranukleárních inkluzí. Ukazuje se navíc, že proteiny obsahující polyglutaminy se za normálních okolností podílejí na regulaci genové exprese. Přesné časové a prostorové vzorce transkripce jsou klíčové jak pro normální vývoj všech buněk a tkání, tak pro regulaci odpovědi diferencovaných buněk na vnější změny, která má klíčový význam pro funkce mozku. U některých polyglutaminových onemocnění (např. u spinocerebelárních ataxií 6a 17) bylo skutečně prokázáno, že mutace postihuje proteiny podílející se na regulaci genové exprese v nervových buňkách. Podobné mechanismy se předpokládají i u dalších polyglutaminových onemocnění – vedle řady spinocerebelárních ataxií mezi ně patří Huntingtonova choroba, dentato-rubro-pallido-luysiánská atrofie a spinobulbární muskulární atrofie (Kennedyho nemoc) (Bednařík et al. 2010).

V poslední době však s pokrokem molekulární genetiky a biochemie dochází k názoru, že na vzniku daného neurodegenerativního onemocnění se většinou nepodílí jednoznačně pouze jeden aberantní protein, ale že dochází k interakci mezi několika zejména strukturálními proteiny. Některá onemocnění tak můžou vykazovat klinické i molekulárně-patologické známky onemocnění charakteristických pro více skupin z výše uvedené klasifikace (Galpern et al. 2006).

1.2 Parkinsonova nemoc

1.2.1 Úvod

Klasická definice:

Parkinsonova nemoc (PN) je chronické progresivní onemocnění nervové soustavy, které se projevuje typickou poruchou hybnosti, tzv. extrapyramidovým hypokineticko-rigidním (neboli parkinsonským) syndromem. Toto postižení vzniká na podkladě degenerativního zániku neuronů v pars compacta mezencefalické substantia nigra, vedoucího k nedostatku dopaminu ve striatu. Porucha hybnosti u PN proto charakteristicky zmírňuje dopaminergní substituční terapie (Růžička et al.2000).

Prevalence PN je 100-150 případů na 100 000 obyvatel, ve věkové skupině nad 60 let je až 1%. Průměrný věk na počátku onemocnění je kolem 60 let, přibližně 10% pacientů onemocní před 40.rokem, 10% po 75. roce. Mezi nemocnými je lehká převaha mužů (1,2: 1).

1.2.2 Etiopatogeneze

PN je charakterizována přítomností Lewyho tělísek a postižením dopaminergních neuronů substantia nigra a dalších definovaných neuronálních populací. Předpokládá se, že na rozvoji tohoto postižení se podílí několik patogenetických procesů (van Dijk et al.2010).

1.2.2.1 Mitochondriální dysfunkce a narůstající oxidativní stres

Již výsledky studií z 80. let 20. století poukázaly na možný spolupodíl mitochondriální dysfunkce na patogenezi PN, když prokázaly redukcí aktivity mitochondriálního komplexu I v substantia nigra u pacientů s PN oproti kontrolní skupině (Shapira et al.1989). I fakt, že

metabolit 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinu (MPTP), jehož efekt spočívá v ovlivnění mitochondriálního elektronového řetězce inhibicí mitochondriálního komplexu I (Tipton a Singer, 1993) může být příčinou parkinsonismu a existence MPTP zvířecího modelu pro PN, dále zdůrazňují roli mitochondriální dysfunkce. Dále byla prokázána inhibice mitochondriálního komplexu I pesticidem rotenonem. Chronická expozice tomuto pesticidu může vyvolat rozvoj symptomů odpovídající PN (Betarbet et al.2000). Mimoto byly prokázány snížené hladiny proteinů vázaných na mitochondrie, např. prohibitinu, ATP syntázy a superoxid dismutázy 2 (SOD2) v substantia nigra a frontálním kortexu u pacientů s PN oproti kontrolní skupině (Ferrer et al.2007). Navíc proteinové produkty řady genů asociovaných s monogenetickými formami parkinsonismu, které zahrnují geny pro alfa-synuklein, Parkin, DJ-1, PINK1, LRRK 2 a HTRA2, se podílejí na mitochondriální dysfunkci a potažmo na oxidativním stresu (Lin a Beal, 2006). Ztráta správné funkce mitochondrií pravděpodobně hraje jednu z hlavních rolí v apoptoticky navozené buněčné smrti pomocí uvolnění pro-apoptotických proteinů cytochromu C, sekundárního přenašeče mitochondriálních aktivátorů kaspáz (SMAC) a HTRA2, a redukci ATP v důsledku oxidativní fosforylace. Dysfunkce mitochondrií dále vede ke zmnožení volných kyslíkových radikálů a tím k nárůstu oxidativního stresu (Schapira 2008). U pacientů s PN je prokázán zvýšený počet oxidativně změněných proteinů v substantia nigra, jako oxidativně modifikovaný UCH-L1 (Choi et al. 2004) a nitrovaný alfa-synuklein (Giasson et al.2000). Kromě zmnožení těchto oxidativně změněných proteinů je dále u pacientů s PN prokazována alterace protektivního antioxidantního systému, nejzřetelněji jsou redukovány hladiny antioxidantu glutationu (GSH) v substantia nigra u pacientů s PN oproti kontrolní skupině (Sian et al.1994).

1.2.2.2 Narušení proteinové degradace

Narušení systémů proteinové degradace je také zvažován v patogenezi PN. Tyto systémy zahrnující cestu lysozomální degradace a ubiquitin proteázový systém, jsou zapojeny v degradaci poškozených proteinů (Betarbet et al.2005). Cesta lysozomální degradace je

například zapojena do degradace oligomerních meziproductů alfa-synukleinu (Lee et al.2004). Tyto oligomerní meziproducty jsou považovány za toxické formy alfa-synukleinu, které jsou příčinou buněčné dysfunkce až buněčné smrti (El-Agnaf et al.2003).

Zahrnutí lysozomální degradace do patogeneze PN je podpořeno alterací genové sekvence pro glukocerebrosidázu, lysozomálního enzymu, v mozkové tkáni pacientů s PN (Lwin et al.2004). Mutace v ubikvitin-proteázovém systému, systému který označuje proteiny s ubikvitinem a transportuje je k proteázám k degradaci, může také vést k rozvoji parkinsonismu (Schapira 2008). Ubikvitin-dependentní proteolytická cesta je ovlivněná u pacientů s mutací genu pro ubikvitin karboxyl esterázu L (UCH-L1), mutací která byla popsána u dvou německých sourozenců (Leroy et al.1998), a u pacientů s mutací genu pro Parkin, jenž zapříčiňuje téměř 50% familiární PN se začátkem v mladém věku (Lucking et al.2000).

1.2.2.3 Agregace proteinů a Lewyho tělíska

Produkce změněných či poškozených proteinů a jejich zhoršená degradace má za následek akumulaci a agregaci těchto proteinů a formování Lewyho tělísek a Lewyho neuritů. Pro Lewyho patologii je typický průkaz alfa-synukleinu, proteinu, který je normálně přítomný v presynaptických zakončeních většiny neuronů. Bodové mutace, duplikace a triplicace genu pro alfa-synuklein jsou asociovány s hereditární formou PN (Polymeropoulos et al.1997; Kruger et al.1998; Zarranz et al.2004). Alfa-synuklein je za fyziologických podmínek většinou přítomen ve své monomerické formě, ale může se vyskytovat i trimetrická forma (Leng et al.2001). U PN a jiných synukleinopatií, monomerický alfa-synuklein agreguje za vzniku insolubilních fibril. Ve vzniklých agregovaných formacích jsou přítomny i jakési vývojové mezistupně, které jsou považovány za toxické formy alfa-synukleinu (El-Agnaf et al.2003; Kazatsev a Kolchinski 2008). Dále mohou být přítomny další faktory, které mohou usnadnit tvorbu fibril resp. agregátů, jako např. bodové mutace genu pro alfa-synuklein, fosforylace alfa-synukleinu na Ser129, snížení pH, zvýšení teploty nebo přítomnost

metalických iontů či jiných nabitých částic (Uversky 2007). Proteomické studie navíc ukázaly, že kromě alfa-synukleinu jsou v Lewyho těliscích přítomny i jiné proteiny, jako kinázy, ligázy, proteiny zapojené na degradaci proteinů, transmembránovém přenosu a oxidativním stresu (Xia a kol 2008).

Výsledky recentních neurochemických studií mozkové tkáně u pacientů s PN prokazují interakci mezi alfa-synukleinem a tau proteinem (Jelliger 2011) a zvýšený výskyt tauopatie u pacientů s PN (Wills et al.2010). Dále bylo zjištěno, že alfa-synuklein je in vivo regulátor fosforylace tau proteinu na Ser (262) a právě mutace alfa-synukleinu jako rizikový faktor výskytu PN podporuje fosforylaci tau proteinu na Ser (262) zapříčiňující instabilitu mikrotubulů, která vede u PN ke ztrátě dopaminergních neuronů (Quereshi et al.2011).

1.2.2.4 Zánět a aktivace glií

V substantia nigra u pacientů s PN je opakovaně prokazována přítomnost změn, typických pro zánětlivou reakci, zahrnující aktivaci mitochondrií, astroglíozu a infiltraci lymfocytů (Hirsch a Hunot 2009). Indikátorem zánětu a zapojení glií na molekulární úrovni jsou zvýšené hladiny interleukinů (Mogi et al.1994) a alterace hladin růstového faktoru (Mogi et al.1999; Parain a kol 1999) v substantia nigra a ve striatu u pacientů s PN. Je zvažováno, že zánětlivé změny přispívají ke kaskádě událostí vedoucích k neurodegeneraci a tudíž k progresi onemocnění (Hirsch a Hunot 2009). Nicméně i samotný zánět může být odpovědný za neurodegenerativní proces. Tuto roli zánětu na patogenezi PN podporuje vztah mezi polymorfismem genů asociovaných se záněty nervové soustavy, jako tumor nekrotizující faktor-alfa (TNF-alfa), interleukin-1-beta a interleukin-6, a rizikem rozvoje PN (Hirsch a Hunot 2009), ale i projektivní efekt nesteroidní antiflogistické terapie (Chen et al.2003).

1.2.2.5 Apoptóza a buněčná smrt

Apoptoticky navozená buněčná smrt je také zvažována jako potenciální patogenetický faktor u PN. Ve studii Mochizukiho et al. byla histochemicky detekovaná přítomnost apoptózy v mezencefalu u 8 z 11 pacientů s PN oproti 1 ze 6 subjektů kontrolní skupiny (Mochizuko et al. 1996). Navíc bylo zjištěno pravděpodobné kompenzatorní zvýšení anti-apoptotických proteinů bcl-2 v nigrostriatálních dopaminergních neuronech pacientů s PN (Yuan a Yanker 2000). Dále byla tamtéž detekována zvýšená přítomnost solubilního Fas, molekuly receptoru signalizující apoptózu, a annexinu V, který hraje roli při apoptóze a nekróze, což také podporuje podíl apoptózy při vzniku PN (Mogi et al. 1996; Werner et al. 2008).

Předpokládá se, že k tomu, aby běžné koncentrace tzv. endotoxinů a exotoxinů vyvolaly selektivní neurodegeneraci dopaminergních buněk, musí existovat genetická predispozice, a to jak v případech s familiárně vázanou PN (Tab. 1), tak u nemocných se sporadickou PN.

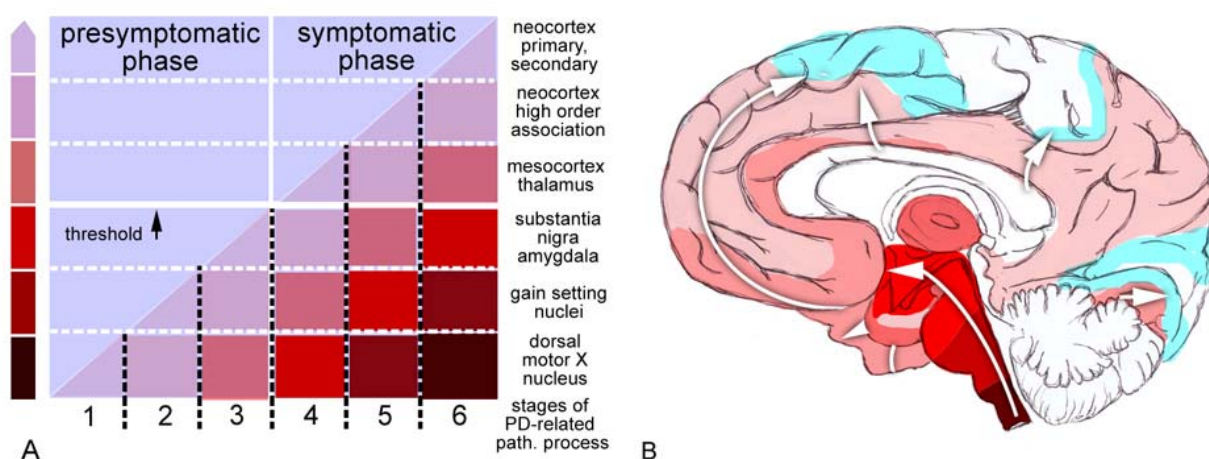
Tab. 1 Přehled genů vedoucích k parkinsonismu a patologie s nimi související

Lokus	Geny	Klinický obraz	Patologie
Dominantní			
PARK1/4	α -Synuclein	Typická PN, může být přítomna deprese	Lewyho tělíska
PARK8	LRRK2	Typická PN	Obvykle Lewyho tělíska: mohou být i tau-klubka
FTDP-17	MAPT	Většinou pod obrazem demence, může být přítomna i typická PN	Tau-klubka
SCA3	Ataxin3	U Evropanů obvykle ataxie, někdy parkinsonismus, ten obzvláště u Afrických národů	Nebývají Lewyho tělíska, spíše polyglutaminové inkluze
SCA2	Ataxin2	U Evropanů obvykle ataxie, často i parkinsonismus, ten obzvláště u Afrických národů	Nebývají Lewyho tělíska, spíše polyglutaminové inkluze
Recesivní			
PARK2	Parkin	Začátek PN v časném věku, velmi pomalá progresse onemocnění	Ojedinele Lewyho tělíska
PARK6	PINK1	Začátek PN v časném věku, velmi pomalá progresse onemocnění	Ojedinéle případy s Lewyho tělíska
PARK7	DJ-1	jen málo informací, pravděpodobně jako Parkin	Neznámá
PARK9	ATP13A2	Agresivní průběh, komplex příznaků parkinsonismu a jiných přídatných symptomů	Neznámá
PARK14	PLA2G6	Agresivní průběh, komplex příznaků parkinsonismu a jiných přídatných symptomů	Lewyho tělíska
SPG11	Spatacsin	Obvykle spastická paraplegie, ale někdy i agresivní průběh, komplex příznaků parkinsonismu a jiných přídatných symptomů	Neznámá

Převzato z Hardy J. Genetic Analysis of Pathways to Parkinson Disease. Neuron. 2010 October 21; 68 (2): 201–206.

1.2.3 Neuropatologie

Typickou patologickou známkou PN jsou Lewyho tělíska, jejichž hlavní složkou je abnormální alfa-synuklein. Podle prací Braaka et al.(2003) tyto změny postupně zasahují predilekční oblasti mozku v šesti stádiích ve vzestupném pořadí od prodloužené míchy až po neokortex (Obr. 1). V počátečních preklinických stádiích (1. a 2.) je zasaženo dorzální motorické jádro n. vagus, bulbus olfactorius a příslušná část nucleus olfactorius anterior. Typické klinické příznaky PN se objevují až ve 3. stadiu, histopatologicky charakterizovaném postižením locus coeruleus a substantia nigra. Ve 4. stadiu proniká patologický proces dále do mezencefala a postihuje magnocelulární cholinergní jádra, zároveň je postižen i temporální mezokortex. Nakonec je v 5. a 6. stadiu patologický proces plně vyjádřen a postihuje i primární a asociační oblasti neokortexu. Tato studie představuje PN jako plynule progredující neurodegenerativní proces, který postupně postihuje řadu mozkových systémů (Obr. 1)



Obr.1. Patologická stádia rozvoje Parkinsonovy nemoci, převzato z Braak et al.2004

1.2.4 Patofyziologie

Podkladem PN je podle klasické definice neuronální úbytek v pars compacta substantiae nigrae s následným snížením syntézy dopaminu. U PN dále bývají prokazovány změny dalších neurotransmiterů (např. serotoninu v nucleu raphe, noradrenalinu v locus coeruleus, GABA v substantia nigra, acetylcholinu v kůře), které se podílejí na vzniku některých příznaků v pozdních stádiích PN. V důsledku neuromediátorového deficitu u PN dochází k rozsáhlé poruše regulace systému bazálních ganglií a jejich spojů.

Klíčovou úlohu při modulaci funkce striata a tím celého systému BG hraje dopaminergní dráha nigrostriatální. Dopamin působí excitačně na buňky opatřené receptory typu D1 (počátek přímé dráhy) a inhibičně na D2 (nepřímá dráha). Různé změny úrovně aktivace a nesouhra v činnosti přímé a nepřímé dráhy striatopallidální tak mohou být podkladem extrapyramidových poruch různých typů. U neléčené PN chybí modulační vliv dopaminu v putamen, tím dochází k relativnímu poklesu aktivity v přímé dráze a k vzestupu aktivity v nepřímé dráze striatopallidální. Výsledkem je hyperaktivita globus pallidus internus vedoucí k útlumu projekce talamokortikální projevující se hypokinezi a k útlumu pedunkulopontinního jádra, jehož výsledkem může být rigidita. Ve skutečnosti je mechanismus rigidity složitější, pod vlivem abnormálních descendentních signálů z bazálních ganglií, talamu a kůry se rozvíjí dysfunkce gama-systému a dlouholatentních napínacích reflexů. Na třesu u PN se podílejí desinhibované fyziologické oscilační mechanismy anatomicky situované do talamických jader a jejich spojů (Růžička et al. 2000).

1.2.5 Klinický obraz

Příznaky Parkinsonovy nemoci můžeme rozdělit na základní projevy, přídatné projevy a komplikace pokročilého stadia (Růžička 2006).

1.2.5.1 Základní projevy

PN může v počátečním období i několik let probíhat nepostřehnutelně a svými nespecifickými příznaky může napodobovat i jiná, než neurologická onemocnění (Williams et al. 2009). Podle Braakovy teorie (viz výše) v této době probíhají preklinická stádia 1. a 2., které se mohou projevovat jako poruchy čichu či abnormálním chováním v REM spánku způsobené poškozením příslušných struktur bulbus olfactorius a jader dolní části mozkového kmene. Zpočátku bývá i často přítomna depresivní symptomatika, která může překrývat počáteční příznaky. V následujících stádiích (3. a 4.), kdy již dochází k poškození substantia nigra a úbytku dopaminu ve striatu, bývají ještě přítomny kompenzační mechanismy (zvýšené uvolňování dopaminu zbývajícími neurony či hypersenzitivita receptorů), které ještě umožňují zachovat normální funkce. Následkem zmíněných mechanismů dochází k rozvoji příznaků PN až při poklesu počtu dopaminergních neuronů a hladiny dopaminu ve striatu pod 50%, respektive dle některých prací až pod 30%. Zpočátku pak bývají obvykle přítomny necharakteristické somatické příznaky (kloubní či svalové bolesti apod.) a až po čase se postupně rozvíjí typické motorické příznaky – hypokineze, rigidita, klidový třes případně posturální poruchy.

Ze základních motorických příznaků pacienta nejvýrazněji omezuje hypokineze (omezení rozsahu pohybu) a příbuzné projevy bradykineze (pohybové zpomalení) a akineze (porucha startu pohybu). Hypokineze na končetinách bývá alespoň z počátku jednostranná nebo asymetrická s převahou na akrech. Časnými hypokinetickými projevy jsou též zmenšení písma (mikrografie), otupělý, maskovitý výraz obličeje (hypomimie), snížený rozkvy horních končetin při chůzi (omezení či ztráta synkinéz) a tichá monotónní řeč (hypofonie, aprozodie), případně dyzartrie se zrychlením tempa řeči (tachyfénie) a s opakováním posledních slabik nebo celých slov (palilálie).

Rigidita obvykle provází hypokinezi, ale nemusejí být oba příznaky vyjádřeny se stejnou intenzitou. Již v počátečních stádiích souvisí s rigiditou svalové bolesti a ztuhlost

končetiny. Výrazněji rigidita postihuje axiální svalstvo a flexory, čímž je dáno typické flekční držení šíje, trupu a končetin.

Typický tremor u PN je převážně klidový, končetinový akrální, o frekvenci 4-6 Hz, ustupující při volném pohybu a mizící ve spánku. Třes se zvyrazňuje stresem, mentálním úsilím, únavou, třes ruky se dále akcentuje při pohybu druhostranné končetiny (stejně jako rigidita) či při chůzi.

Posturální poruchy, tj. flekční držení trupu, nejistota ve stoji, šouravá chůze s drobnými kroky, zárazy a náhlé pulze vedoucí k pádům určují tíži postižení nemocného a kvalitu života v pozdním stádiu PN. Nekomplikovaná PN však nikdy nevede k úplné ztrátě schopnosti stoje a chůze.

1.2.5.2 Přídavné projevy

Mimo výše zmíněných základních projevů se u pacientů s PN vyskytují příznaky vyplývající z postižení vegetativního nervstva a psychické změny. Tyto změny se vyskytují ve stádiích 4–6 dle Braaka a odrážejí postupující postižení jader mozkového kmene, ascendentních neuronálních systémů a u nejtěžších případů i podkoří a kůry frontálních laloků.

Z vegetativních poruch to bývá již od časných stádií zácpa a seborea (mastná šupinatá kůže v obličeji a ve vlasaté části). Ostatní vegetativní příznaky bývají nekonstantní, vyskytují se převážně v pozdních stádiích a mohou být potencovány vlivy léčby (poruchy trávení, hypersalivace, zvýšené pocení, ortostatická hypotenze, mikční a sexuální poruchy).

Z psychických změn je nejčastější deprese, která může být přítomna již na počátku onemocnění. Poruchy kognitivních funkcí (zvláště exekutivní dysfunkce) mohou u nemocných po letech přerůst v globální kognitivní deficit dosahující až demence (Tab. 2).

Tab. 2 Příznaky Parkinsonovy nemoci	
Motorické příznaky	Non-motorické příznaky
Třes, bradykineze, rigidita, posturální instabilita	Kognitivní deficit, bradyfrenie,
Hypomimie, dysartrie, dysfagie, sialorea	Deprese, apatie, anhedonie, únava, další behaviorální a psychické problémy
Snížení synkinéz končetin, šouravá chůze, obtížné vstávání ze židle, otáčení se na lůžku	Senzorické příznaky: anosmie, ageuzie, bolest (ramena, záda), parestézie
Mikrografie, obtíže s krájením jídla, jezením, hygienou, zpomalení každodenních aktivit	Dysautonomie (ortostatická hypotenze, zácpa, močové a sexuální dysfunkce, zvýšené pocení, seborea), snížení hmotnosti
Glabelární reflex, blefarospasmus, dystonie, skolióza, kamptokormie	Potíže se spánkem (tzv. REM behaviour disorder, živé sny, usínání během dne, fragmentace spánku, syndrom neklidných nohou)

Převzato z Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2008 Apr; 79 (4): 368-76.

1.2.5.3 Komplikace pokročilého stádia

Komplikace pokročilého stádia PN jsou dány společným projevem progresu choroby do vyšších stádií a dlouhodobé nepřírozené lékové stimulace dopaminových receptorů. Jako fluktuace hybnosti se označuje zkrácené trvání či výpadky účinku jednotlivých dávek léčby – kolísání mezi akineticko-rigidními „off“ stavy a stavy zlepšené hybnosti tzv. „on“ stavy. Podkladem této fluktuace je snížená skladovací kapacita pro dopamin při postupujícím zániku nigrostriatálních neuronů a také receptorové změny vyvolané nefyziologickou stimulací.

Polékové dyskineze choreatického či choreodystonického charakteru postihují většinu pacientů dlouhodobě léčených levodopou. Na jejich vzniku se podílejí farmakodynamické mechanismy, tj. přechodná relativní hypersenzitivita a dysbalance mezi subtypy receptorů pro dopamin na vrcholu účinku dávky dopaminergní medikace. Tzv. off-dystonie se naopak

může objevovat v období relativně nejnižší hladiny dopaminu, jako bolestivé stočení akra horní či dolní končetiny.

Polékové psychotické projevy (halucinace, bludy či delirium) vznikají jako vedlejší nežádoucí účinky dopaminergní, anticholinergní aj., a to především u pacientů s již existujícím kognitivním deficitem (Růžicka et al. 2000)..

1.2.6 Formy Parkinsonovy nemoci

PN je onemocnění velmi heterogenní. Může se lišit rozdílným vyjádřením klinických příznaků, věkem při začátku onemocnění, různou rychlostí rozvoje, reakcí na léčbu, atd.. Dle těchto hledisek existuje řada návrhů, jak je možné toto onemocnění dělit do jednotlivých subtypů. Zde jsou příklady dělení.

Dělení dle věku na počátku onemocnění (Quinn et al.1987):

Juvenilní PN s počátkem před 20. rokem života má téměř vždy genetický podklad AR typu a pozitivní rodinnou anamnézu (RA). V diferenciální diagnóze připadá v úvahu tzv. Westphalova varianta Huntingtonovy nemoci, u které je však téměř vždy pozitivní RA a přítomnost kognitivní dysfunkce. Diagnostické je genetické vyšetření. Juvenilní PN se může projevovat dystonií s vyjádřeným diurnálním kolísáním a tudíž je na místě pomýšlet i na dopa-responsivní dystonii (DYT 5), kterou možno vyloučit genetickým vyšetřením nebo sledováním dalšího průběhu, kdy u DYT 5 je odpověď na levodopu celoživotní a nedochází k rozvoji fluktuací hybnosti (Casseron et al.2005).

Young-onset PN s počátkem před 40. rokem života má často genetický podklad AR (gen Parkin) nebo AD (gen LRRK2) typu. Oproti klasické formě PN je nižší riziko rozvoje demence a psychotických komplikací. Odpověď na dopaminergní terapii je výborná, časně však dochází k rozvoji fluktuací hybnosti.

Pozdní forma PN s počátkem po 70. roku se vyznačuje častější komorbiditou s vaskulárním postižením mozku a je proto často mylně diagnostikována jako "vaskulární PS". Pozdní forma PN má větší tendenci k rozvoji demence a psychotických komplikací, ale menší riziko rozvoje fluktuací hybnosti (Papapetropoulos et al.2004).

Dělení dle dominující klinické symptomatiky (Alves et al.2006):

Tremor dominantní forma PN se projevuje především třesem, který je obzvláště klidový, v pokročilejších stádiích se však rozvíjí i posturální a akční. Třes bývá až do pokročilých stádií dominujícím příznakem, a pacienta obtěžuje více než akineze a rigidita. Pacienti s tímto typem PN mají rovněž nižší riziko rozvoje demence a psychotických komplikací. V diferenciální diagnostice je nutno pomýšlet ne esenciální třes, kde ale chybí odpověď na dopaminergní terapii. Rovněž vyšetření denzity dopaminového transportéru v bazálních gangliích pomocí SPECT a radiofarmaka ioflupan (preparát DaT Scan, viz též následující sekce Diagnostika) je u pacientů s esenciálním třesem normální.

PN s dominující axiální rigiditou a poruchami chůze (PIGD - postural-instability-gait-difficulty) se projevuje především axiální rigiditou a poruchami chůze. U tohoto typu PN je popisován rychlejší rozvoj kognitivního postižení a je považován za rizikový faktor rozvoje demence u PN. Zvažuje se, že klinická manifestace je pravděpodobně způsobena predilekčním postižením nondopaminergních systémů.

Dělení dle recentní prospektivní clusterové analýzy užitá a podpořená retrospektivní klinicko-patologickou studií (Lewis et al.2005; Selichova a kol 2009):

PN s časným začátkem (EDO-Earlier disease onset): věk při počátku onemocnění méně než 55 let

Tremor dominantní forma (TD-Tremor dominant): Věk při počátku onemocnění 55 a více let, klidový třes jako iniciální symptom nebo přetrvávající dominantní třes nad bradykinezi a rigiditou

Non-tremor dominantní forma (NT- Non-tremor dominant): věk při počátku onemocnění 55 a více let, převažující bradykineze s žádným či jen mírným klidovým třesem, častý rozvoj kognitivního deficitu

PN s rychlou progresí bez příznaků demence (RDP- Rapid disease progression without dementia): úmrtí do 10 let od nástupu klinických příznaků PN, bez závislosti na věku při počátku onemocnění, bez rozvoje demence, s rychlou progresí poruch hybnosti do pokročilých stádií vyjádřených pomocí stupnice Hoehnové &Yahra.

1.2.7 Diagnostika

Diagnóza PN je založena především na cílené anamnéze a klinickém neurologickém vyšetření. PN je klinicky pravděpodobná, jsou-li přítomny nejméně dva ze tří hlavních příznaků (hypokineze a rigidita, nebo klidový třes), onemocnění má plynule progredující průběh, nejsou nalezeny žádné další příznaky, které by svědčily pro jiné onemocnění, a není prokázána žádná jiná choroba, která by mohla vyvolávat parkinsonský syndrom. Podpurným anamnestickým znakem je jednostranný začátek příznaků či jejich přetrvávající asymetrie. Hlavním diagnostickým testem PN je ověření odpovídacosti na dopaminergní podnět. Mezinárodně uznávaná diagnostická kritéria dle United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank (UKPDS BB) jsou uvedena v následující tabulce (Tab. 3).

Tab. 3 Diagnostická kritéria pravděpodobné Parkinsonovy nemoci dle UK Parkinson's Disease Society Brain Bank
Krok 1
Bradykineze
Přítomnost nejméně jednoho z následujících kritérií:
Rigidita
Klidový třes o frekvenci 4–6 Hz
Posturální instabilita, která není zapříčiněná primárním postižením zraku, vestibulárního aparátu, mozečku nebo propioceptivní dysfunkcí
Krok 2
Vyloučení jiných příčin parkinsonismu
Krok 3
Přítomnost nejméně tří z následujících podpurných (prospektivních) kritérií:
Jednostranný začátek
Klidový třes
Progredující postižení
Přetrvávající asymetrie ve prospěch primárně postižené strany
Výborná odpověď (70–100%) na terapii levodopou
Závažné levodopou navozené dyskineze (chorea)
Odpověď na terapii levodopou po dobu 5 let a déle
Klinický průběh 10 let a déle

Převzato z Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2008 Apr; 79 (4): 368-76.

Dále můžeme u pacientů s podezřením na PN provést vyšetření jednofotonovou emisní tomografií (SPECT) realizované na pracovišti nukleární medicíny. U tohoto vyšetření dochází po podání radioaktivní látky, která se váže na presynaptické dopaminové transportéry, k průkazu presynaptického dopaminergního deficitu ve striatu. Nedokáže však odlišit PN od jiných onemocnění, u nichž je postižen jak presynaptický, tak postsynaptický oddíl dopaminergního systému (multisystémová atrofie, progresivní supranukleární paralýzy aj.) (Růžička et al. 2000).

1.2.8 Diferenciální diagnóza

Příčiny parkinsonismu lze rozdělit do čtyř skupin: primární (idiopatický) parkinsonismus, sekundární (symptomatický) parkinsonismus, heredodegenerativní parkinsonismus a parkinson-plus syndromy. PN tvoří asi 80% všech případů parkinsonského (hypokineticko-rigidního) syndromu (PS). Dalších 10% představují symptomatické PS provázející různá postižení mozku (cévní onemocnění, metabolické, opakovaná traumata, toxické a polékové poruchy, aj.) a 10% je tvořeno dalšími degenerativními onemocněními mozku vyznačujícími se mimo jiné i příznaky PS jako jsou např. progresivní supranukleární obrna, multisystémová atrofie, Alzheimerova nemoc, aj. (Tab.4). Příznaky vybraných neurodegenerativních onemocnění, které se manifestují PS, jsou uvedeny v Tab.5.

Tab. 4 Příčiny parkinsonismu
Primární parkinsonismus (Parkinsonova nemoc) – 80%
Sporadická
Známa (prokázaná) genetická etiologie
Sekundární parkinsonismus (enviromentální etiologie) – 10%
Léky
Blokátory dopaminergních receptorů (nejč. antipsychotika)
Látky snižující storage (ukládání) dopaminu (reserpin, tetrabenazin)
Postencefalitický
Toxiny: Mn, CO, MPTP, kyanid
Vaskulární
Mozkové tumory
Kraniocerebrální traumata
Normotenzní hydrocefalus
Parkinson-plus syndromy – 5-10%
Progresivní supranukleární paralýza
Multisystémová atrofie
Kortikobazální degenerace
Demence s Lewyho tělísky
Guamský komplex (Parkinson-demence-ALS komplex)
Heredodegenerativní onemocnění – 5-10%
Alzheimerova demence
Wilsonova nemoc
Huntingtonova nemoc
Frontotemporální demence (mutace tau proteinu vázaná na chromozomu 17q21)
X-vázaná dystonie – parkinsonismus (u filipínských mužů, známá jako lubag)

Převzato z Fahn S. Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome Ann. N. Y. Acad. Sci. 991: 1–14 (2003).

Tab.5 – příznaky vybraných neurodegenerativních onemocnění manifestujících se parkinsonským syndromem

	PN	PSP	MSA	CBGD	DLB	AD
Symetrický deficit	+	+++	+++	-	+	-
Axiální rigidita	+	+++	++	+	+	+
Bradykineze	+	+	+	+	+	±
Tremor	+++	-	±	±	±	-
Rigidita	++	+	+	+	+	±
Dystonie končetin	+	+	+	++	+	-
Posturální instabilita	++	+++	+++	+	++	-
Vertikální paréza pohledu	+	+++	+	++	+	±
Dysautonomie	+	-	++	-	+	-
Odpověď na Levodopu	+++	-	+	-	++	-
Asymetrická kortikální atrofie	-	-	-	++	-	+
Demence	±	+	-	±	++	+++

Převzato z: Pahwa R. et al. Handbook of Parkinson's disease, Third edition (2003), Marcel Dekker, Inc., New York

1.2.9 Terapie

PN není možno v současné době vyléčit a ani není znám účinný postup ke zpomalení progresu, můžeme však účinně tlumit symptomy a zlepšit tak kvalitu života. Terapeutické možnosti jsou farmakologické, rehabilitační a neurochirurgické. Při zahájení léčby bereme v úvahu:

1. kognitivní stav
2. anamnézu psychotické poruchy
3. funkční postižení
4. věk

1.2.9.1 Farmakoterapie PN

Hlavní těžiště medikamentózní terapie PN je v symptomatických postupech zahrnující substituci chybějícího dopaminu a kompenzaci sekundární mediátorové dysbalance. Současná farmakoterapie mění klinický obraz onemocnění tak, že na jedné straně potlačuje příznaky nemoci, ale na druhé zase sama může způsobovat nežádoucí příznaky, jako pozdní hybné komplikace a psychické komplikace. S postupnou progresí onemocnění je nutné stálé navyšování dávek medikace, což zvyšuje výskyt nežádoucích účinků. Uvádí se, že po 5 letech terapie L-DOPA trpí 50-60% pacientů pozdními komplikacemi souvisejícími s terapií. Dochází ke snížení efektivity dopaminergní medikace a zužování tzv. terapeutického okna. K omezení výskytu pozdních komplikací navozených L-DOPA je nutné její přesné dávkování a optimální kombinace s jinými preparáty.

Terapii tedy zahajujeme dopaminergním preparátem – levodopou či agonistou dopaminu (ropinirol, pramipexol aj.). U mladých, kognitivně intaktních, preferujeme agonisty dopaminu, zatímco u starších pacientů a pacientů s kognitivní poruchou či psychotickou epizodou v anamnéze preferujeme levodopu. Při zahájení podáme domperidon k zabránění periferních dopaminergních nežádoucích účinků – nauzey a hypotenze. Při nedostatečném efektu monoterapie přistupujeme ke kombinovanému užívání dopaminergního agonisty a L-dopy + inhibitory karboxylázy s inhibitorem COMT. Toto vede k postupnému uvolňování dopaminergní stimulace, čímž se omezuje výskyt „on-off“ fluktuací. Pokud i přes tuto změnu medikace není dostačující kompenzace hybnosti, pak přichází na řadu kontinuální podávání buď apomorfinu, nejsilnějšího dopaminergního agonisty s krátkodobým účinkem, subkutánně za pomoci infuzní pumpy nebo Duodopy (L-dopy v podobě gelu) podávané cestou perkutánní endoskopické gastrostomie (PEG) přímo do duodena, taktéž za použití pumpy. U obou těchto preparátů jsou však přísná indikační kritéria, které je nutno v zájmu pacienta a s očekáváním efektu striktně dodržovat (Růžička 2006).

1.2.9.2 Neurochirurgická léčba PN

U kognitivně intaktních pacientů s jinak neřešitelnými fluktuacemi hybnosti se vždy zvažuje neurochirurgické řešení – hluboká mozková stimulace (DBS). Stereotaktická technika při DBS umožňuje na základě vyšetření zobrazovacími metodami a zaměření pomocí souřadnicového systému velmi přesné zacílení struktur v hloubi mozku. Při DBS je do příslušného jádra trvale zavedena elektroda vysílající nízkovoltážní kmity o frekvenci nad 100 Hz. Hlavním cílem u DBS je subthalamické jádro, jehož oboustrannou stimulací lze potlačit všechny hlavní příznaky a výrazně redukovat antiparkinsonskou medikaci. Předpokladem dobrého efektu této metody je vedle kvalitně provedeného neurochirurgického výkonu, adekvátní výběr pacienta a odpovídající následná péče .

1.2.9.3 Rehabilitace

Nedílnou součástí léčebné péče o pacienta s PN jsou režimová opatření, rehabilitace, cvičení a pohybová reedukace, jejichž cílem je aktivní potlačování těch příznaků, které mohou být překonány, úpravy režimu a tvorba náhradních stereotypů.

1.3 Vyšetření mozkomíšního moku u neurodegenerativních onemocnění

1.3.1 Úvod

Definitivní diagnóza neurodegenerativních onemocnění je stanovena až po smrti na základě patologického vyšetření mozku při autopsii. Za života je diagnostika resp. diferenciální diagnostika neurodegenerativních onemocnění založena především na klinickém obraze, na zobrazovacích vyšetřeních a popřípadě na zkoušce odpovídavosti na dopaminergní podnět. Proto je nyní výzkum neurodegenerativních onemocnění intenzivně soustředěn na přesnější a včasnou diagnostiku ještě za života pacientů, což by vedlo k dřívějšímu terapeutickému ovlivnění onemocnění a lepší predikci průběhu a prognózy. Mozkomíšní mok se vzhledem ke svému těsnému kontaktu s mozkovou tkání jeví jako potenciální zdroj markerů neurodegenerace u žijících pacientů. Specifické proteiny hrají jednu z hlavních rolí v patogenezi neurodegenerativních onemocněních, a proto se stanovení hladin těchto proteinů v mozkomíšním moku jeví jako slibný ukazatel neurodegenerace. Nicméně se předpokládá, že většina proteinů v mozkomíšním moku má původ spíše z krve, než z okolní mozkové tkáně. Proteiny pocházející z krve vstupují do mozkomíšního moku skrze choroidální plexus a putují po proudu moku z postranních komor do subarachnoidálního prostoru (Huhmer et al.2006). Následkem toho jsou rozdílné hladiny těchto proteinů v komorovém a lumbálním moku (Reiber 1994). Spektrum proteinů mozkomíšního moku kromě proteinů pocházejících z krve však tvoří i proteiny mozkové tkáně. Recentní proteomické studie uvádí, že více než 10% identifikovatelných proteinů v mozkomíšním moku se překrývá s proteiny detekovanými ve vzorcích kortexu frontálních laloků získaných při autopsii (Pan et al.2007). A naopak, ve stejné studii bylo více než 20% proteinů detekovaných ve frontálním kortexu detekovatelných v mozkomíšním moku (Pan et al.2007). Proteiny mozkové tkáně, které nejsou detekovatelné v mozkomíšním moku mohou být buď vázány na membrány (Mogi et al.1996) nebo mohou recyklovat v rámci mozkové

tkáně ve formě insolubilních agregátů, anebo je jejich koncentrace v lumbálním mozkomíšním moku tak nízká, že není možná jejich detekce (Shi et al.2009).

1.3.2 Možnosti vyšetření mozkomíšního moku u neurodegenerativních onemocnění

V současnosti je laboratorní analýza jak mozkomíšního moku, tak séra u neurodegenerativních onemocnění užívána obzvláště k vyloučení infekčního a paraneoplastického postižení. K tomuto je ve většině případů použito jen základního cytologického vyšetření (průkaz neutrofilních granulocytů, aktivovaných forem lymfocytů a monocytů, průkaz rakovinových buněk), biochemického vyšetření (hladina proteinorachie, glykorachie, laktátu) a průkazu protilátek proti známým neurotropním mikroorganismům a virům (př. borreliových protilátek, protilátek proti neurotropním virům, neurolues aj.) Nynější možnosti vyšetření mozkomíšního moku jsou však mnohem rozsáhlejší a obsahují jak celé spektrum markerů, které hrají roli v jednotlivých zvažovaných patogenetických procesech podílejících se na vzniku neurodegenerativních onemocnění, tak vyšetření hladin produktů vzniklých jako následek těchto dějů. Zde jsou uvedeny příklady detekovatelných markerů postižení centrální nervové soustavy tříděných dle úlohy v jednotlivém z uvažovaných patogenetických procesů:

- mitochondriální dysfunkce a oxidativní stres – glutation, ceruloplasmin, transferin, feritin, haptoglobin aj.
- degradace proteinů – beta-glukocerebrosidáza, beta-manosidáza, beta-galaktosidáza, cystatin C
- agregace proteinů – těžké řetězce neurofilament (NFH), fosforylované těžké řetězce neurofilament (NFHp), lehké řetězce neurofilament (NFL), osteopontin
- zánět a aktivace glií – interleukiny (IL) – IL-1beta, IL-2,4,6,8,10,12; růstové faktory, systém komplementu (C3b, C4alfa, C4b)
- apoptóza a buněčná smrt – Bcl-2, annexin V

- proteiny související s patogenetickým procesem – tau protein, fosforylovaný tau protein, beta-amyloid₁₋₄₂, beta-amyloid₁₋₄₀, beta-amyloid₁₋₃₈, alfa-synuklein.

1.3.3 Proteiny asociované s Alzheimerovou demencí ve vztahu k Parkinsonově nemoci

Patologické změny typické pro Alzheimerovu demenci jsou poměrně častým nálezem u pacientů s PN (Mattila et al.1998). Právě tři likvorové markery, jmenovitě tau protein, fosforylovaný tau protein a beta-amyloid₁₋₄₂, typické pro AD jsou opakovaně studovány u PN. Recentní studie navíc prokazují, že právě alfa-synuklein se in vivo podílí na regulaci fosforylace tau proteinu a při mutaci alfa-synukleinu asociované s PN dochází ke zvýšené vazbě alfa-synukleinu na tau protein, stimuluje se jeho fosforylace a tím dochází k destabilizaci mikrotubulů (Quereshi et al.2010).

U pacientů s AD jsou opakovaně prokazovány vyšší hladiny tau proteinu a fosfo-tau proteinu, nižší hladiny beta-amyloidu₁₋₄₂ a vyšší hodnoty indexu tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ (Sunderland et al.2003; Mattson et al.2009). Výsledky studií, které se zabývaly vyšetřením těchto tří markerů tzv. „tripletu“ v mozkomíšním moku u pacientů s PN ale nevykazují jednotné výsledky. Byly prokázány nižší hladiny beta-amyloidu₁₋₄₂ u pacientů s PN oproti kontrolní skupině (Bibi et al 2007; Compta et al. 2009; Parnetti et al.2008; Sjögren et al.2002), ale spíše jsou ve větší míře zastoupeny studie, které neprokazují rozdíly mezi hladinami beta-amyloidu₁₋₄₂ u PN a u kontrolní skupiny (Holmberg et al.2003; Lins et al.2004; Mollenhauer et al.2006; Verbeek et al.2004; Zhang et al.2008). Byly demonstrovány vyšší hladiny tau proteinu a fosfo-tau proteinu u PN oproti kontrolní skupině (Abdo et al.2007; Compta et al.2009), ale převažuje však počet studií, které rozdíly neprokázaly (Abdi et al.2006; Kahle et al.2000; Lidstrom et al.2001). Recentní studie uvádí, že u pacientů s PN je nižší hladina beta-amyloidu₁₋₄₂ v mozkomíšním moku spojena s vyšším rizikem rozvoje kognitivního deficitu (Siderowf et al.2010).

Dále je tento „triplet“ často sledován u PN s demencí (PDD) či u demence s Lewyho tělísky (DLB). U těchto onemocnění výše uvedené markery vykazují oproti kontrolní skupině bez kognitivního deficitu podobné změny jako u AD. Změny jsou navíc tím bližší AD, čím je kognitivní deficit více vyjádřen tzn., že u DLB prokazujeme vyšší hladiny tau proteinu a indexu tau/beta a nižší hladiny beta-amyloidu₁₋₄₂ oproti PDD (Andersson et al.2011, Aerts et al. 2011), u DLB byla dále prokázána souvislost vyšší hladiny tau proteinu s kratším přežíváním (Boström et al.2009). Toto může na jedné straně pomoci ke stanovení pravděpodobné diagnózy, na straně druhé naopak vede k úvahám, zda DLB není jen jakýmsi mezistupněm v přirozeném vývoji PDD v AD.

Hladiny tau proteinu, fosfo-tau proteinu a jednotlivých izoform tau proteinu jsou také vyšetřovány u pacientů s PN a s tzv. atypickými parkinsonskými syndromy ve snaze ke zlepšení jejich diferenciální diagnostiky. Vyšší hladiny tau proteinu a fosfo-tau proteinu oproti pacientům s PN jsou demonstrovány u pacientů s kortikobazální degenerací (Aerts et al.2010). Stejně tak vyšší hladiny tau proteinu v mozkomíšním moku byly prokázány u pacientů s PSP-Parkinsonismem a MSA oproti pacientům s Richardsonovým syndromem, PN a kontrolní skupinou (Süssmuth et al.2010). U PSP výsledky studií dále uvádějí signifikantně nižší poměr izoform tau proteinu 33kDa/55 kDa jak oproti kontrolní skupině, tak oproti ostatním neurodegenerativním onemocněním (Borroni et al.2009; Borroni et al.2008).

Další studie navíc uvádí, že zvýšené hladiny celkového tau proteinu oproti fosforylovanému tau proteinu v mozkomíšním moku nejsou specifické pro AD patologii. Zvažuje se, že hladiny celkového tau proteinu odráží zvýšené uvolňování strukturálních proteinů z poškozených axonů, dendritů, synapsí a souvisí s buněčnou smrtí. Tento názor podporují výsledky některých studií, kde byly zvýšené hladiny celkového tau proteinu v mozkomíšním moku prokázány např. po kraniocerebrálních traumatech (Ost et al.2006; Blennow et al.2004) a při akutní cévní mozkové příhodě (Yao et al.2008).

2 Vyšetření likvorových markerů neurodegenerace u Parkinsonovy nemoci

Kvůli nezářídka prokazovaným patologickým změnám typickým pro AD u PN a spolupodílu alfa-synukleinu na regulaci fosforylace tau proteinu jsme se rozhodli o sledování neurodegenerativních markerů tau proteinu a beta-amyloidu₁₋₄₂ právě u PN. Již řada studií byla na toto téma publikována s nejednotnými výsledky (viz kap. 1.3.3). V jen ojedinělých studiích jsou však korelovány hladiny uvedených markerů s bližšími klinickými parametry onemocnění (trvání nemoci, tíže postižení atd.). V další části předkládané práci jsme se nejprve zaměřili na korelaci hladin neurodegenerativních markerů v likvoru s délkou trvání onemocnění a dále s tíží motorického deficitu. U pacientů s PN jsme kromě tau proteinu a beta-amyloidu₁₋₄₂ stanovovali také hladiny cystatinu C a clusterinu v mozkomíšním moku. V další části jsme rozdělili pacienty s PN do klinických subtypů, jak bylo publikováno v předchozí prospektivní klinické studii a retrospektivní klinicko-patologické studii a sledovali korelace mezi hladinami neurodegenerativních markerů v likvoru a jednotlivými klinickými subtypy.

2.1 Laboratorní ukazatele neurodegenerace v likvoru a míra motorického postižení u Parkinsonovy nemoci: korelační studie

Vranová H., Kaňovský P., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D., Nestrašil I., Zapletalová J. Laboratorní ukazatele neurodegenerace v likvoru a míra motorického postižení u Parkinsonovy nemoci: korelační studie. *Cesk Slov Neurol N*; 2008, vol.71/104, no. 3, s.324-328. **IF** ₂₀₀₈ **0,319**

Souhrn:

V první studii zaměřené na vyšetření neurodegenerativních markerů v likvoru u pacientů s Parkinsonovou nemocí jsme použili tzv. Braakův koncept. Ten dělí postižení u PN do 6 stupňů dle rozsahu neuropatologických změn a dává je do korelace s klinickým stavem hodnoceným pomocí Hoehn-Yahrovy stupnice. Předpokládali jsme tedy, že tíže postižení by mohla korelovat s hladinami určitých markerů v likvoru, které se při neurodegeneraci uvolňují do mozkomíšního moku. Dále jsme chtěli zkoumat potenciální korelaci hladin neurodegenerativních markerů v likvoru s délkou trvání nemoci. Vzhledem k malému počtu pacientů a nerovnoměrnému rozložení hodnot, které neumožňovaly korelační analýzu, jsme byli nuceni zvolit jinou alternativu. Dle spektra pacientů, kteří jsou do specializovaného centra odesíláni se skupina s PN přirozeně rozdělila do dvou skupin – s délkou trvání nemoci do 2 let a více než 2 roky.

U pacientů s PN a u kontrolní skupiny byly vyšetřeny hladiny tau proteinu, beta-amyloidu₁₋₄₂ a cystatinu C v likvoru. U všech pacientů s PN byly neuropsychologickým vyšetřením vyloučeny příznaky demence, aby bylo zabráněno zkreslení výsledků.

U pacientů s PN byly zjištěny signifikantně vyšší hladiny tau proteinu oproti kontrolní skupině ($p=0,05$). Dále byly u pacientů s PN do 2 let trvání nemoci zjištěny signifikantně vyšší hladiny tau proteinu v likvoru ($p=0,03$) a vyšší hodnoty indexu tau protein/beta amyloid₁₋₄₂ ($p=0,01$) oproti pacientům s délkou trvání nemoci nad 2 roky. Nebyla prokázána korelace hladin tau

proteinu v likvoru s tíží motorického postižení vyjádřeného Hoehn-Yahrovou stupnicí. Ostatní sledované hodnoty nevykázaly žádnou korelaci s diagnózou, délkou trvání onemocnění či tíží motorického postižení.

Výsledky provedené studie tedy svědčí o přínosné roli stanovení tau proteinu v likvoru jako laboratorního ukazatele přítomnosti neurodegenerace u pacientů s PN, a to zvláště u pacientů s délkou trvání onemocnění do dvou let od rozvoje prvních klinických příznaků. Fakt, že nebyla prokázána korelace hladin tau proteinu s tíží motorického postižení by mohl svědčit o tom, že tau protein odráží spíše než rozsah proběhlých neurodegenerativních změn, intenzitu aktuálního neurodegenerativního procesu.

Laboratorní ukazatele neurodegenerace v likvoru a míra motorického postižení u Parkinsonovy nemoci: korelační studie

Laboratory Markers of Neurodegeneration in Cerebrospinal Fluid and Degree of Motor Involvement in Parkinson Disease: A Correlation Study

Souhrn

Parkinsonova nemoc (PN) je chronické progredientní neurodegenerativní onemocnění. U pacientů s tímto onemocněním dochází procesem neurodegenerace k morfologickým a neurochemickým změnám centrálního nervového systému, které jsou vyjádřeny postupnou progresí nemoci. Tzv. Braakův koncept dělí toto postižení do 6 stupňů a ty uvádí do korelace s klinickým stavem, hodnoceným pomocí Hoehnovy-Yahrový stupnice. Zároveň je známo, že neurodegenerativním procesem dochází k elevaci určitých laboratorních ukazatelů v likvoru. Cílem předkládané studie bylo stanovení koncentrací neurodegenerativních ukazatelů v likvoru u pacientů s PN a u kontrolní skupiny jedinců, a dále zjistit, zda v podskupině pacientů s PN existují korelace mezi těmito hladinami a délkou trvání onemocnění či mírou motorického postižení vyjádřeného Hoehnovou-Yahrovou stupnicí. Do studie bylo zařazeno 32 pacientů s PN a 20 jedinců bez příznaků neurodegenerativního onemocnění jako kontrolní skupina. U všech jedinců byly stanoveny hladiny tau-proteinu, beta-amyloidu₍₁₋₄₂₎ a cystatinu C v likvoru a dále vypočítán index tau-protein/beta-amyloid₍₁₋₄₂₎. U pacientů s PN byly zjištěny signifikantně vyšší hladiny tau-proteinu v likvoru oproti kontrolní skupině ($p = 0,05$). Dále byly u pacientů s PN do 2 let trvání nemoci zjištěny signifikantně vyšší hladiny tau-proteinu v likvoru ($p = 0,03$) a vyšší hodnoty indexu tau-protein/beta-amyloid₍₁₋₄₂₎ ($p = 0,01$) oproti pacientům s délkou trvání nemoci nad 2 roky. Nebyla prokázána korelace hladin tau-proteinu v likvoru s tíží motorického postižení vyjádřeného Hoehnovou-Yahrovou stupnicí. Ostatní sledované hodnoty nevykázaly žádnou korelaci s diagnózou, délkou trvání onemocnění či tíží motorického postižení. Výsledky provedené studie svědčí o přínosné roli stanovení tau-proteinu v likvoru jako laboratorního ukazatele přítomnosti neurodegenerace u pacientů s PN, a to zvláště u pacientů s délkou trvání onemocnění do 2 let od prvního projevu klinických příznaků.

H. Vranová¹, P. Kaňovský,
J. Mareš¹, M. Nevrlý¹,
D. Stejskal^{2,3}, I. Nestršil¹,
J. Zapletalová⁴

¹Neurologická klinika LF UP a FN Olomouc

²Oddělení laboratorní medicíny, Nemocnice Šternberk o.z., Středomoravská nemocniční a.s.

³Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP v Olomouci

⁴Ústav lékařské biofyziky LF UP v Olomouci



MUDr. Hana Vranová
Neurologická klinika
Fakultní nemocnice Olomouc
I.P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail: vranovaha@seznam.cz

Přijato k recenzi: 20. 4. 2007
Přijato do tisku: 8. 4. 2008

Klíčová slova

Parkinsonova nemoc – tau-protein – beta-amyloid – cystatin C – likvor

Key words

Parkinson disease – tau-protein – beta-amyloid – cystatin C – CSF

Abstract

Parkinson disease (PD) is a progressive degenerative illness of the nervous system. Patients with this illness undergo a progress of neurological degeneration leading to morphological and neurochemical changes in the central nervous system. The Braak concept divides this pathology into six stages which are correlated with clinical assessment using the Hoehn-Yahr scale. The severity of neurodegeneration is known to correlate with certain laboratory indicators in CSF. The aim of this study was to assess tau-protein, beta-amyloid₍₁₋₄₂₎ and cystatin C CSF levels in patients suffering from PD and in the control group and to compare CSF levels between these two groups and correlate to both the duration and severity of motor impairment in PD. Tau-protein, beta-amyloid₍₁₋₄₂₎ and cystatin C in CSF were assessed and the tau-protein/beta-amyloid₍₁₋₄₂₎ ratio was calculated in 32 patients suffering from PD and in a control group (CG) of 20 patients. The following statistically significant differences in the CSF were found: higher tau-protein levels in PD patients versus CG ($p = 0.05$), higher tau-protein levels ($p = 0.03$) and tau-protein/beta-amyloid₍₁₋₄₂₎ ratio ($p = 0.01$) in PD patients with duration less than 2 years vs. PD with duration more than 2 years. No significant correlation was found between the tau-protein CSF levels and the severity of motor manifestation of PD. No difference in levels of beta-amyloid₍₁₋₄₂₎ and cystatin C in CSF was found in the CG and PD patients groups. Presented study indicates an important role for the tau-protein CSF level evaluation as a marker of neurodegeneration in PD patients, especially within the first two years of the appearance of clinical symptoms.

Úvod

Parkinsonova nemoc (PN) je chronické neurodegenerativní onemocnění, u kterého je hlavní poruchou deficit dopaminu v oblasti bazálních ganglií. Deficit je způsoben sníženým transportem dopaminu do oblasti striata cestou nigrostriálních projekcí a jeho prvotní příčinou je apoptotický zánik melaninových buněk v oblasti substantia nigra v mezencefalu [1].

Podstatou patofyziologie PN je funkční defekt bílkoviny zvané alfa-synuklein, čímž se PN řadí mezi synukleinopatie. V postižených neuronech u PN nacházíme Lewyho tělíska, což jsou intraneuronální inkluze v cytoplazmě blízko jádra. Lewyho tělíska jsou složena z různých proteinů, pro diagnostiku je nejdůležitější přítomnost ubiquitinu, proteinu p62 a alfa-synukleinu. Výsledky nedávno zveřejněných studií svědčí o tom, že součástí Lewyho tělísek je i degenerovaný tau-protein, který navíc potencuje degeneraci alfa-synukleinu a tímto se podílí na patogenezi PN [2–5].

Kromě výše popsané poruchy jsou ale u PN popisovány další morfologické a neurochemické změny, které jsou spojeny s postupnou progresí nemoci. Nedávno publikovaný tzv. Braakův koncept [6,7] uvádí 6 stupňů prokázáno morfologického postižení centrální nervové soustavy v průběhu progresu PN, přičemž těchto 6 stupňů koreluje s klinickým stavem, který je možno vyjádřit hodnotami Hoehnvy-Yahrový stupnice. Podle této koncepce jsou v průběhu PN postižovány v podstatě všechny struktury centrální nervové soustavy (CNS).

Morfologické změny tkání CNS podle Braakova konceptu jsou působeny relativně pomalu progredujícím neurodegenerativním procesem. Zároveň tento koncept počítá s tím, že míra neurodegenerativního procesu koreluje s tíží motorického postižení [8].

Je známo, že neurodegenerace souvisí s přítomností určitých laboratorních ukazatelů v likvoru. Lze předpokládat, že míra motorického postižení u PN hodnocená pomocí Hoehnvy-Yahrový stupnice by mohla souviset s určitou koncentrací neurodegenerativních ukazatelů (tau-protein, beta-amyloid₍₁₋₄₂₎, cystatin C) v likvoru.

Cílem předkládané studie bylo stanovení koncentrací neurodegenerativních ukazatelů v likvoru u pacientů s PN a u kontrolní skupiny jedinců a dále zjistit, zda v podskupině pacientů s PN existují korelace mezi těmito hladinami a délkou trvání onemocnění či mírou motorického postižení vyjádřeného Hoehnvy-Yahrovou stupnicí.

Tau-protein

Tau-protein se za normálních podmínek podílí na integritě buněčného cytoskeletu. Pokud dojde k jeho nadměrné fosforylaci, jak k tomu dochází u řady neurodegenerativních onemocnění včetně PN, pak dochází k poruše integrity buňky, ztrátě její fyziologické funkce, až k buněčné smrti. Očekávané hodnoty tau-proteinu v likvoru u zdravých jedinců jsou kolem 160 ng/l (ng/l = nanogram/litr).

Beta-amyloid

Beta-amyloid je tvořen z amyloidového prekurzorového proteinu (APP). APP je štěpen buď alfa-sekretázou a produktem je sAPPa, u něhož se předpokládá, že má neuroprotektivní význam, a nebo beta-amyloid štěpícím enzymem (BACE), čili beta-sekretázou a v následném kroku gama-sekretázou a produktem štěpení je beta-amyloid40 a beta-amyloid42. Ty tvoří po agregaci jádro neuritických plak. Následuje kaskáda dalších procesů, např. oxidativní stres, cytotoxické jevy a zánětlivá odpověď a výsledkem je zánik neuronu a rozvoj demence. Snížená hladina beta-amyloidu v likvoru je nalézána u pacientů s Alzheimerovou demencí [9,10] či u pacientů s PN s demencí [9]. Očekávané hodnoty beta-amyloidu v likvoru u zdravých jedinců jsou kolem 850 pg/ml a pro hodnocení degenerace se využívá spíše než prosté stanovení s výhodnou index tau-protein/beta-amyloid [11].

Cystatin C

Cystatin C je inhibitor cysteinových proteáz, které hrají důležitou roli např. v procesu trávení potravy, aktivaci komplementu či krevní koagulaci. Cystatin C se účastní procesu neuronální degenerace a reparace centrálního nervového systému tak, že v mozku pravděpodobně inhibuje aktivitu katepsinu L v astrocytech, který spolu s katepsinem S patří ke klíčovým komponentám regulace imunitního potenciálu astrocytů a mikroglie. Dále je cystatin C podle současných znalostí považován za

amyloidogenní protein, který se vyskytuje společně s beta-amyloidem ve stěnách arteriol u pacientů s Alzheimerovou demencí. Díky zvýšení koncentrace cystatinu C v určitých tkáních či systémovém oběhu dochází např. k precipitaci amyloidu v cerebrálních cévách, cerebrálním hemoragiím a akcelerované ateroskleróze [12,13].

Pacienti a metodika

Skupina vyšetřovaných

Studie byla schválena ústavní etickou komisí a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

V rámci studie bylo vyšetřeno 32 pacientů trpících PN bez příznaků demence, 9 žen, 23 mužů, ve věku 29–77 let, průměrný věk $59,9 \pm 11,96$ let, průměrný věk na začátku onemocnění byl $55,2 \pm 12,77$ let, průměrná doba trvání nemoci $4,4 \pm 3,6$ let. 12 pacientů bylo léčeno L-dopou, průměrná dávka byla $492,3 \pm 137,2$ mg denně, průměrná doba trvání terapie L-dopou byla $3,92 \pm 3,4$ let.

Jako kontrolní skupina bylo vyšetřeno 20 pacientů, 9 žen, 11 mužů, ve věku 32–73 let, průměrný věk $51,2 \pm 10,74$ let. Kontrolní skupinu tvořilo 6 pacientů s vertebrálními onemocněními, 6 pacientů s psychogenními poruchami, 3 pacienti po cévní mozkové příhodě, 2 pacienti s tenzní cefaleou, 2 pacienti s diabetickou neuropatií a 1 pacient po boreliové infekci. Diagnóza PN byla stanovena podle kritérií United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank [14]. Kognitivní deficit byl vyloučen psychologickým vyšetřením, jehož součástí byl Mini Mental Status Examination (MMSE). U všech pacientů byly vyšetřeny hladiny tau-proteinu, beta-amyloidu_(1–42) a cystatinu C v likvoru.

Laboratorní vyšetření a technika náběru likvoru

Likvor byl získáván cestou lumbální punkce, která byla prováděna za obvyklých sterilních kautel při poloze vyšetřovaného vsedě, vpich byl směřován do meziobratlového prostoru L4/5. Při punkci bylo odebráno celkem 10 ml likvoru do sterilní zkumavky. Po odběru byl likvor vyšetřen morfologicky a centrifugován (10 min při 1 100 g

Tab. 1. Demografická data.

	Parkinsonova nemoc	Kontrolní skupina	Statistická významnost
ženy	9 (28,1 %)	9 (45 %)	0,2 ^a
muži	23 (71,9 %)	11 (55 %)	
věk – průměr $\pm$ směrodatná odchylka (roky)	$59,9 \pm 11,96$	$51,2 \pm 10,74$	0,01 ^b

^a χ^2 test, ^b dvouvýběrový t-test

při 4 °C). Z části vzorku byly stanoveny hladiny cystatinu C, druhá část byla zamražena při –80 °C a do 10 týdnů od zamražení byla v sérii u všech osob změřena koncentrace celkového tau-proteinu (ELISA, Biosource, Velká Británie), beta-amyloidu_(1–42) (ELISA, Innogenetics, Belgie) a cystatinu C (ELISA, Biovendor, Česká republika). Analytické charakteristiky všech ELISA metod při verifikaci údajů výrobce byly uspokojivé (opakovatelnost i reprodukovatelnost < 9 %). Současně byl u všech pacientů proveden výpočet indexu tau-protein/beta-amyloid_(1–42) v likvoru [11].

Rozdělení souboru na podskupiny

Pro hodnocení sledovaných parametrů byly výsledky porovnány mezi skupinou pacientů s PN a kontrolní skupinou. V podskupině pacientů s PN byly dále výsledky sledovaných ukazatelů porovnávány s mírou motorického postižení, vyjádřeného hodnotami Hoehnovy-Yahrovovy stupnice. Ke zjištění korelace sledovaných ukazatelů s délkou trvání onemocnění byla podskupina pacientů s PN rozdělena na pacienty s délkou trvání nemoci do 2 let (včetně) a nad 2 roky, hodnoty pak byly porovnány mezi oběma skupinami.

Statistické zpracování dat

Data byla zpracována pomocí software Medcalc (Belgie). Ke zjištění rozdílů mezi skupinou pacientů s PN a kontrolní skupinou a dále v podskupinách pacientů s PN byly použity pro kategoriální znaky χ^2 test, pro metrické parametry Studentův t-test, resp. Mannův-Whitneyův test. K posouzení závislosti hodnot měrných parametrů a Hoehnovy-Yahrovovy stupnice byla použita neparametrická Spearmanova korelační analýza. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

Neparametrické testy pro analýzu dat byly použity z důvodu nenormální distribuce parametrů (pro testy normality byl použit test Shapiro-Wilk), resp. z důvodů přítomnosti extrémních hodnot v datech.

Výsledky

Při porovnání demografických dat obou skupin bylo zjištěno, že skupiny mají stejné zastoupení obou pohlaví, avšak skupina jedinců s PN je oproti kontrolní skupině signifikantně starší ($p = 0,01$) (tab. 1).

Bylo zjištěno, že jedinci s PN měli významně vyšší koncentrace tau-proteinu v likvoru oproti kontrolní skupině (mediány 225 vs 197 ng/l; $p = 0,05$). Ostatní sledované hodnoty se v obou skupinách významně nelišily (tab. 2, graf 1).

U jedinců s PN s délkou trvání nemoci do 2 let byly nalezeny významně vyšší koncentrace tau-proteinu v likvoru (mediány 263 vs 202 ng/l; $p = 0,03$) a vyšší hodnota indexu tau-protein/beta-amyloid_(1–42) (mediány 0,44 vs 0,23; $p = 0,04$) oproti pacientům s délkou trvání nemoci nad 2 roky (tab. 3, graf 2). Ostatní sledované hodnoty se podle doby trvání nemoci významně nelišily.

U hladin tau-proteinu byla zjištěna korelace s tíží motorického postižení vyjádřeného Hoehnovou-Yahrovou stupnicí, tato korelace však nedosahovala hladiny statistické významnosti ($p = 0,07$). U ostatních sledovaných parametrů nebyla zjištěna souvislost s tíží motorického postižení vyjádřeného Hoehnovou-Yahrovou škálou (tab. 4).

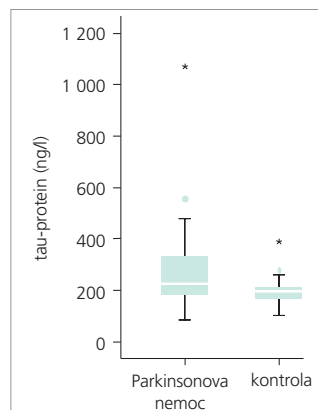
Diskuse

V rámci předkládané práce jsme prokázali významně vyšší hladinu tau-proteinu v likvoru u pacientů s PN oproti kontrolní skupině, což koreluje s výsledky provede-

Tab. 2. Porovnání sledovaných hodnot u pacientů s Parkinsonovou nemocí vs kontrolní skupina pomocí neparametrického Mann-Whitney testu.

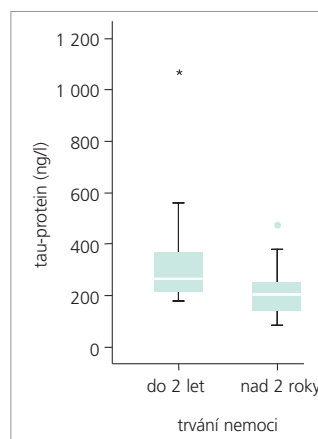
	Parkinsonova nemoc	Kontrolní skupina	Statistická významnost
tau-protein (ng/l)	225,0	197,0	0,05
medián (minimum/maximum)	(82/1 070)	(102/389)	
SD	181,7	62,0	
beta-amyloid ₍₁₋₄₂₎ (pg/l)	685,1	826,1	0,06
medián (minimum/maximum)	(232,1/1 470,9)	(325,8/1 190,7)	
SD	294,4	206,5	
index tau-protein/ beta-amyloid ₍₁₋₄₂₎	0,29	0,25	0,08
medián (minimum/maximum)	(0,13/2,23)	(0,10/0,47)	
SD	0,47	0,08	
cystatin C (mg/l)	3,51	4,22	0,12
medián (minimum/maximum)	(0,68/8,19)	(2,34/8,63)	
SD	1,87	1,35	

SD – směrodatná odchylka

**Graf 1.** Porovnání hladin tau-proteinu v likvoru u pacientů s PN vs kontrolní skupina.**Tab. 3.** Porovnání sledovaných hodnot u pacientů s PN nemocí do 2 let trvání nemoci (PN 1) vs trvání nemoci nad 2 roky (PN 2) pomocí neparametrického Mann-Whitney testu.

	PN 1	PN 2	Statistická významnost
tau-protein (ng/l)	263,0	202,0	0,03
medián (minimum/maximum)	(177–1070)	(82–478)	
SD	240,6	102,7	
beta-amyloid ₍₁₋₄₂₎ (pg/l)	604,2	723,7	0,24
medián (minimum/maximum)	(401,0–1282,6)	(232,1–1470,9)	
SD	256,6	317,7	
index tau-protein/ beta-amyloid ₍₁₋₄₂₎	0,44	0,23	0,01
medián (minimum/maximum)	(0,24/2,23)	(0,13/1,64)	
SD	0,54	0,41	
cystatin C (mg/l)	3,995	3,090	0,20
medián (minimum/maximum)	(0,68/8,19)	(0,69/6,38)	
SD	1,89	1,81	

SD – směrodatná odchylka

**Graf 2.** Porovnání hladin tau-proteinu v likvoru u pacientů s PN do 2 let trvání nemoci vs s délkou trvání nemoci nad 2 roky.

ných studií o jeho spolupodílu na vzniku onemocnění, nekoreluje však s dříve provedenou studií u jedinců s PN bez příznaků demence [15]. Tento výsledek však může být ovlivněn právě tím, že skupina jedinců s PN je signifikantně starší [16].

Současně jsme prokázali signifikantně vyšší hladinu tau-proteinu v likvoru u pacientů s PN do 2 let od manifestace prv-

ních symptomů nemoci. Tento fakt nás vedl k hypotéze, že k neurodegeneraci pravděpodobně dochází v největší míře (resp. že neurodegenerativní proces je nejvíce intenzivní) v počátečním stadiu, tj. tehdy, když tíže patologických změn v mozku „prolomí“ hranici klinické manifestace. Dříve provedené studie prokázaly vyšší hladinu tau-proteinu u jedinců s PN

s demencí oproti jedincům s PN bez příznaků demence [17]. Proto by bylo vhodné u zařazených jedinců s PN následně klinicky sledovat jejich kognitivní deficit a zvýšení hladiny tau-proteinu v likvoru jako potenciální ukazatel pozdějšího rozvoje demence [18].

Limitací studie však zůstává, že u jedinců zařazených do kontrolní skupiny mohli

Tab. 4. Vyjádření vztahu závažnosti motorického postižení u pacientů s PN hodnocené pomocí Hoehnovy-Yahrový škály (H–Y) se sledovanými hladinami uvedených parametrů v likvoru (hodnoceno pomocí Spearmanova korelačního koeficientu).

	Tau-protein	Beta-amyloid _(1–42)	Index tau/beta	Cystatin C
korelační koeficient (r)	0,31	0,06	0,15	0,13
oboustranná významnost (c)	0,07	0,74	0,41	0,48

index tau/beta – index tau-protein/ beta-amyloid_(1–42)

taktéž probíhat blíže neurčený neurodegenerativní proces, který u nich v době odběru likvoru nebyl klinicky vyjádřen.

Závěr

Závěrem lze shrnout, že stanovení tau-proteinu v likvoru lze považovat za přínosný laboratorní ukazatel přítomnosti neurodegenerace u pacientů s PN. Za cennou považujeme skutečnost, že jsme prokázali jeho zvýšení především u osob, u kterých trvá nemoc 2 roky a méně od prvního projevu klinických příznaků. Stanovení beta-amyloidu_(1–42) ani cystatinu C se u našeho souboru pacientů s PN neosvědčilo. Stejně tak se nám nepodařilo prokázat ani významnou souvislost mezi uvedenými ukazateli a stupněm motorického poškození.

V současnosti asi nedokážeme jednoznačně říci, zda Braakův staging progresu Parkinsonovy nemoci do detailu odpovídá skutečnosti, a to jednoduše proto, že počáteční stupně stagingu (tj. I–III) budou moci být jen velmi obtížně klinicko-patologicky korelovány u více případů, pokud vůbec. Výsledky naší studie zatím nesvědčí ve prospěch hypotézy, že hladina neurodegenerativních markerů v likvoru pacientů s PN koreluje s tíží jejich motorického postižení, hodnoceného pomocí Hoehnovy-Yahrový stupnice.

Literatura

1. Růžička E, Roth J, Kaňovský P et al. Extrapyramidová onemocnění 1. Parkinsonova nemoc a Parkinsonské syndromy. Praha: Galén 2000.
2. Arima K, Hirai S, Sunohara N, Aoto K, Izumiyama Y, Ueda K et al. Cellular co-localization of phosphorylated tau- and NACP/alpha-synuclein-epitopes in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease and in

dementia with Lewy bodies. Brain Res 1999; 843(1–2): 53–61.

3. Ishizawa T, Mattila P, Davies P, Wang D, Dickson DW. Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies. J Neuropathol Exp Neurol 2003; 62(4): 389–397.
4. Esposito A, Dohm CP, Kermer P, Bähr M, Wouters FS. Alpha-Synuclein and its disease-related mutants interact differentially with the microtubule protein tau and associate with the actin cytoskeleton. Neurobiol Dis 2007; 26(3): 521–531.
5. Jensen PH, Hager H, Nielsen MS, Hojrup P, Gliemann J, Jakes R. Alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. J Biol Chem 1999; 274(36): 25481–25489.
6. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiology of Aging 2003; 24(2): 197–211.
7. Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. Cell Tissue Res 2004; 318(1): 121–134.
8. Muller J, Wenning GK, Jellinger K, McKee A, Poewe W, Litvan I. Progression of Hoehn and Yahr stages in Parkinsonian disorders: a clinicopathologic study. Neurology 2000; 55(6): 888–891.
9. Bibl M, Mollenhauer B, Esselmann H, Lewczuk P, Klafki HW, Sparbier K et al. CSF amyloid-Beta-peptides in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. Brain 2006; 129(Pt 5): 1177–1187.
10. Portelius E, Zetterberg H, Andreasson U, Brinkmalm G, Andreasen N, Wallin A et al. An Alzheimer's disease-specific Beta-amyloid fragment signature in cerebrospinal fluid. Neurosci Lett 2006; 409(3): 215–219.

11. Stejskal D, Vavroušková J, Mareš J, Urbánek K. Application of new laboratory marker assays in neurological diagnosis – a pilot study. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2005; 149(2): 265–266.

12. Mareš J, Stejskal D, Vavroušková J, Urbánek K, Herzig R, Hlušík P. Use of cystatin C determination in clinical diagnostics. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2003; 147(2): 177–180.
13. Mareš J, Herzig R, Urbánek K, Vranová H, Hlušík P, Stejskal D et al. Využití stanovení cystatinu C u pacientů s neurodegenerativními chorobami. Česk Slov Neurol N 2006; 69/102(3): 195–199.
14. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1992; 55(3): 181–184.
15. Molina JA, Benito-Leon J, Jimenez-Jimenez FJ, Ortí-Pareja M, Berbel A, Tallón-Barranco A et al. Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of non-demented Parkinson's disease patients. Neurosci Lett 1997; 238(3): 139–141.
16. Yang W, Ang LC, Strong MJ. Tau protein aggregation in the frontal and entorhinal cortices as a function of aging. Brain Res Dev Brain Res 2005; 156(2): 127–138.
17. Mollenhauer B, Trenkwalder C, von Ahsen N, Bibl M, Steinacker P, Brechlin P et al. Beta-amyloid 1–42 and tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease dementia. Dement Geriatr Cogn Disord 2006; 22(3): 200–208.
18. Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM et al. Cerebrospinal fluid tau/Beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. Arch Neurol 2007; 64(3): 343–349.

2.2 Likvorové markery neurodegenerace u Parkinsonovy nemoci

Přikrylová Vranová H, Mareš J, Nevrlý M, Stejskal D, Zapletalová J, Hlušík P, Kaňovský P. CSF markers of neurodegeneration in Parkinson's disease. J Neural Transm (2010) 117: 1177–1181 IF₂₀₁₀ **2,597**

Souhrn:

V navazující studii, ve které byl jen nepatrně pozměněn soubor pacientů s PN a rozšířena kontrolní skupina, byl k již vyšetřovaným markerům neurodegenerace přidán clusterin. Ten se v organismu podílí na ochranných a reparačních pochodech a jeho hladiny by tedy mohly korelovat s tíží degenerativního procesu. Z důvodu nenalezení korelace hladin markerů v likvoru s tíží motorického postižení u PN, jsme upustili od tzv. Braakova konceptu a zaměřili jsme se spíše korelaci s délkou trvání nemoci.

Hladiny tau proteinu, beta-amyloidu₁₋₄₂, cystatinu C a clusterinu byly vyšetřeny u skupiny pacientů s PN bez příznaků demence a dále u kontrolní skupiny. Z důvodu přetrvávající nemožnosti provést korelační analýzu byly i v této práci pacienti s PN rozděleni do dvou podskupin, s délkou trvání nemoci méně než 2 roky a více než 2 roky.

U pacientů s PN byly nalezeny vyšší hladiny tau proteinu ($p=0,045$) a clusterinu ($p=0,004$) oproti kontrolní skupině. Dále byly u pacientů s PN s délkou trvání nemoci méně než 2 roky nalezeny vyšší hladiny tau proteinu ($p=0,033$), vyšší hodnoty indexu tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ ($p=0,011$) a vyšší hladiny clusterinu ($p=0,044$) oproti pacientům s PN s délkou trvání nemoci více než 2 roky. Nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly mezi hladinami beta-amyloidu₁₋₄₂ a cystatinu C ve srovnání skupiny pacientů s PN a kontrolní skupiny, ani mezi podskupinami pacientů s PN.

Výsledky této práce potvrdily uvažovanou roli vyšetření tau proteinu v likvoru jako markeru neurodegenerativního procesu u pacientů s PN, která byla prezentována v předchozí studii.

Vyšší hladiny clusterinu u pacientů s PN navíc mohou demonstrovat to, že během neurodegenerace jsou přítomny nejen pro-apoptické, ale i anti-apoptické mechanismy. Vyšší hladiny tau proteinu a také clusterinu u pacientů s PN s délkou trvání nemoci méně než 2 roky mohou podporovat hypotézu, že k neurodegenerativnímu procesu dochází v největší míře v počátečních stádiích onemocnění.

CSF markers of neurodegeneration in Parkinson's disease

Hana Přikrylová Vranová · Jan Mareš ·
Martin Nevrlý · David Stejskal · Jana Zapletalová ·
Petr Hlušík · Petr Kaňovský

Received: 19 May 2010 / Accepted: 3 August 2010 / Published online: 21 August 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Parkinson's disease (PD) is a chronic, progressive, neurodegenerative disease with a multifactorial etiology. Protein accumulation is speculated by some to play a prominent role in the pathogenesis of PD. The severity of neurodegeneration should correlate with cerebrospinal fluid (CSF) levels of these neurodegenerative markers (NDMs). The aims of the study were to assess the CSF levels of tau protein, beta-amyloid (1–42), cystatin C, and clusterin in patients suffering from PD and in a control group, to compare the CSF levels between the two groups and to correlate them to PD duration. NDMs in the CSF were assessed in 32 patients suffering from PD and in a control group (CG) of 30 patients. The following statistically significant differences in the CSF were found: higher tau protein ($p = 0.045$) and clusterin levels ($p = 0.004$) in PD patients versus CG; higher tau protein levels ($p = 0.033$), tau protein/beta-amyloid (1–42) ratio ($p = 0.011$), and clusterin ($p = 0.044$) in patients suffering from PD for <2 years versus patients suffering PD for more than 2 years. No differences between

beta-amyloid (1–42) and cystatin C CSF levels were found in the CG and PD patients groups. Significantly higher tau protein and clusterin CSF levels in the group of PD patients with disease duration of <2 years probably reflect the fact that most neurodegenerative changes in PD patients occur in the initial stage of disease.

Keywords Parkinson's disease · Tau protein · Clusterin · CSF · Neurodegeneration

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a chronic, progressive, neurodegenerative disease with a multifactorial etiology (Marras and Lang 2008; Weintraub et al. 2008). Several mechanisms have been implicated as crucial to PD pathogenesis: oxidative stress (Alam et al. 1997), mitochondrial dysfunction (Schapira 2008), protein aggregation and misfolding (Cookson and van der Brug 2008), inflammation, excitotoxicity, apoptosis and other cell death pathways, and loss of trophic support. No one mechanism appears to be primary in all cases of PD, and these pathogenic mechanisms likely act synergistically through complex interactions to promote neurodegeneration (Yacoubian and Standaert 2009). The pathologic hallmark of PD is degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc), resulting in depletion of striatal dopamine (McNaught and Olanow 2006). Some surviving neurons contain eosinophilic intracytoplasmic inclusions, or Lewy bodies, which are in part composed of numerous proteins. Protein accumulation is speculated by some to play a prominent role in the pathogenesis of PD, and the appearance of proteins in Lewy bodies tends to support this notion. The neurodegenerative process in PD is not limited to the

H. Přikrylová Vranová (✉) · J. Mareš · M. Nevrlý · P. Hlušík ·
P. Kaňovský
Department of Neurology, Faculty of Medicine and Dentistry,
Palacky University in Olomouc, and University Hospital
Olomouc, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic
e-mail: vranovaha@seznam.cz

D. Stejskal
Department of Medical Chemistry and Biochemistry,
Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University
in Olomouc, and University Hospital Olomouc, I.P. Pavlova 6,
775 20 Olomouc, Czech Republic

J. Zapletalová
Department of Medical Biophysics,
Faculty of Medicine and Dentistry,
Palacky University in Olomouc, Olomouc,
Czech Republic

SNc, and neuronal loss with Lewy body formation also occurs in other brain regions, which may account for both motor and nonmotor features of the disease (Jenner and Olanow 2006; Braak et al. 2003). An understanding of the mechanisms underlying the development and progression of PD pathology is critical for the development of neuroprotective therapies. Currently, the therapy of PD is rather symptomatic, and its neuroprotective effect is speculative. Moreover, timing of the therapy onset remains controversial. Demonstration of neurodegeneration in the early stage of the disease should lead to consideration of timely therapy with neuroprotective effect.

Neurodegeneration is known to be related to the presence of certain biochemical markers in the cerebrospinal fluid (CSF), tau protein and beta-amyloid (1–42) as markers of protein dysfunction, cystatin C as amyloidogenic protein and clusterin as preventive cell-death protein (Bibl et al. 2006; Mareš et al. 2003). Therefore, the intensity of the neurodegenerative process is thought to be related to particular concentrations of specific biochemical markers (tau protein, beta-amyloid (1–42), cystatin C, clusterin) in the CSF (Vranová et al. 2008, 2009). The presented study aimed to document the neurodegenerative process using determination of the concentrations of these markers in the CSF of both PD patients and control subjects. In addition, this study aimed to seek potential correlation between these levels and the duration of the disease in PD patients.

Patients and methods

Study group

The study was approved by the institutional ethics committee and all patients signed an informed consent.

A total of 32 patients suffering from PD without signs of dementia were examined: 10 females, 22 males, aged 37–77 years, mean age 59.9 ± 11.26 years, mean age at onset 55.2 ± 12.77 , mean duration of disease 4.4 ± 3.6 years. Twenty patients were treated with L-DOPA of mean dose 492.3 ± 137.2 mg daily, mean duration of treatment with L-DOPA 3.92 ± 3.4 years.

The control group comprised 30 patients: 13 females 17 males, aged 33–79, mean age 58.8 ± 10.22 years. Of those, 12 patients had vertebrogenic disease, 9 patients had psychogenic disease, 5 had migraine, 2 patients had tension headache, and 2 patients had diabetic neuropathy. Parkinson's disease was diagnosed using the United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank criteria (Hughes et al. 1992). Cognitive deficit was excluded by psychological assessment involving the Mini-Mental Status Examination (MMSE). In all patients, CSF levels of tau protein, beta-amyloid (1–42), cystatin C, and clusterin were measured.

Laboratory analysis and CSF sampling technique

The CSF samples were obtained by lumbar puncture performed in the morning using a 20-gauge atraumatic spinal needle under the usual sterile conditions, with the subjects sitting and the needle being inserted between lumbar vertebrae L4/L5. During each puncture, 10 ml of CSF was collected in a sterile polypropylene tube and immediately frozen at -80°C until analysis. Within 10 weeks of freezing, in all subjects in the series, the concentrations of total tau protein (ELISA, Biosource, Great Britain), beta-amyloid (1–42) (ELISA, Innogenetics, Belgium), cystatin C (ELISA, Biovondor, Czech Republic), and clusterin (ELISA, Biovondor, Czech Republic) were measured. Analytical characteristics of all ELISA methods when verifying the manufacturers' data were satisfactory (both repeatability and reproducibility $<9\%$). At the same time, the CSF tau protein/beta-amyloid (1–42) ratio was calculated in all patients (Stejskal et al. 2005).

Division of the group into subgroups

To evaluate the studied parameters, the results were compared between the PD patient group and the control group and then between PD patient subgroups.

We would like to correlate NMD levels with disease duration, but it was impossible due to small patient sample size. Our tertiary Movement Disorders center usually gets referred either patients with suspicion for PD or patients with advanced stage of PD. Therefore, our PD group spontaneously divided into two subgroups with duration of ≤ 2 and > 2 years, and the values were compared between these two groups.

Statistical analysis

Medcalc (Belgium) software was used for statistical analysis. To determine differences between the PD patient group and the control group as well as those in the subgroups of patients with PD, the chi-square test was used for categorical variables. Among continuous variables, Student's *t* test was used for age with presumed normal distribution and non-parametric tests for all other assessments. Mann–Whitney test was used for comparing the groups, whereas the possible dependence of values of metric parameters on age was assessed by the non-parametric Spearman's correlation analysis. The *p* value < 0.05 was considered to be statistically significant. The reason for using nonparametric tests for data analysis was the abnormal distribution of parameters (the Shapiro–Wilk test for normality), namely the presence of extreme values in the data.

Results

The comparison of demographic data in the two groups showed that both sexes and ages are equally represented in the groups. (Table 1). No correlation was found between any studied parameter and age in both PD patient group and control group.

The PD patients were found to have significantly higher concentrations of CSF tau protein (median 225 vs. 194.5 ng/l; $p = 0.045$) and clusterin (median 9,004 vs. 4,668 IU/l; $p = 0.004$) than the control subjects (Fig. 1, 2). The other studied parameters did not significantly differ between the two groups.

Significantly higher levels of CSF tau protein (median 263 vs. 202 ng/l; $p = 0.033$), tau protein/beta-amyloid (1–42) ratio (median 0.44 vs. 0.23 ng/l; $p = 0.011$), and clusterin (median 1,0168.5 vs. 6,370.0 IU/l; $p = 0.044$) were found in patients with <2 years since the first symptoms had manifested (Fig. 3, 4).

Discussion

The presented study showed significantly higher levels of CSF tau protein and clusterin in the PD patients when compared with the control group. At the same time, significantly higher levels of CSF tau protein and clusterin were found in patients with <2 years since the first symptoms had manifested.

Tau protein, under normal conditions, contributes to the integrity of the cytoskeleton. Its excessive phosphorylation, as in the case of numerous neurodegenerative diseases including PD, results in impaired cell integrity, loss of its physiological function, and even cell death. Inclusion of tau protein is found with alpha-synuclein as a part of Lewy bodies in patients with PD (Arima et al. 1999; Esposito et al. 2007). Elevation of total tau protein CSF levels is considered a marker of neurodegeneration. In presented study, the presence of higher tau protein levels is in accordance with the results of previous studies concerning its contribution to the development of the disease, but does

Table 1 Demographic data

	PD patients	Controls	<i>p</i> value
Females	10 (31.3%)	13 (43.3%)	0.33 ^a
Males	22 (68.8%)	17 (56.7%)	
Age, mean $\pm$ SD (years)	59.9 $\pm$ 11.26	58.8 $\pm$ 10.22	0.67 ^b

PD Parkinson's disease, SD standard deviation

^a Chi-square test

^b Two-sample *t* test

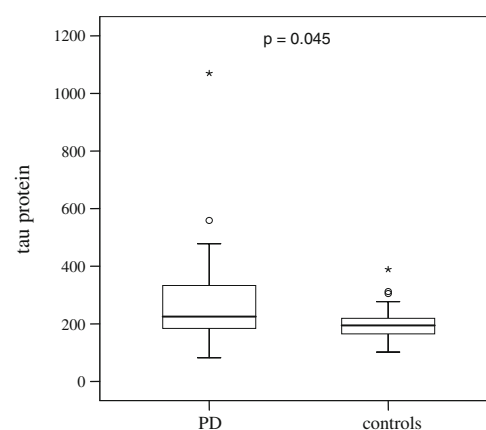


Fig. 1 Comparison of tau protein in the CSF of PD patients and controls

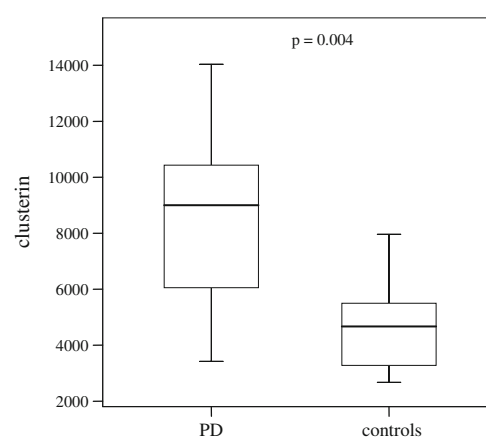


Fig. 2 Comparison of clusterin in the CSF of PD patients and controls

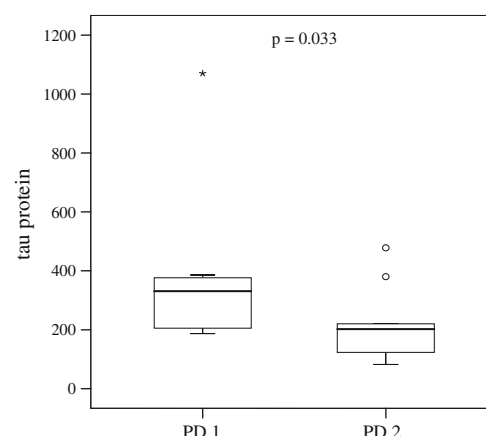


Fig. 3 Comparison of tau protein in CSF of patients with PD duration of ≤ 2 years (PD 1) and > 2 years (PD 2)

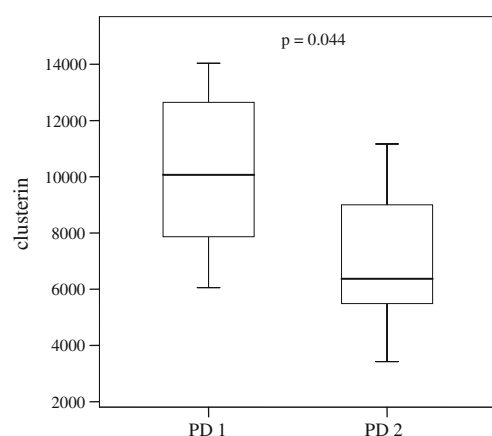


Fig. 4 Comparison of clusterin in CSF of patients with PD duration of ≤ 2 years (PD 1) and > 2 years (PD 2)

not correlate with an earlier study carried out in individuals suffering from PD without signs of dementia (Molina et al. 1997).

Clusterin, a heterodimeric glycoprotein, has been described to attribute to many cellular physiologic functions, including cell–cell interactions, complement inhibition, lipid transportation, cell survival, and apoptosis. Clusterin, also called apoprotein J, is induced under cytotoxic conditions to protect cells from cytotoxic stress (Pucci et al. 2008). It has been reported that clusterin is associated with many degenerative diseases, such as Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB), and multiple system atrophy (MSA) (Sasaki et al. 2002). Higher clusterin levels in PD patients bear witness to presence of cell-death protective mechanism during neurodegeneration.

At the same time, significantly higher levels of CSF tau protein and clusterin were found in patients with < 2 years of disease duration since the first symptoms had manifested. This led to the hypothesis that the highest degree of degeneration (i.e. the most intensive neurodegenerative process) is likely to occur in the initial stage, i.e., when the severity of pathological changes in the brain exceed the threshold of clinical manifestation.

Earlier studies showed higher levels of tau protein in patients with PD with dementia than in those with PD without signs of dementia (Mollenhauer et al. 2006). Therefore, the studied PD patients should be subsequently clinically monitored for cognitive deficit to see whether increased levels of tau protein in the CSF may serve as a potential marker of the later development of dementia (Fagan et al. 2007).

Nevertheless, the study has several limitations. The first limitation is the small size of the PD patient group. The other possible limitation (fairly rather improbable) of the study is that an unspecified neurodegenerative process, not

manifested clinically at the time of CSF collection, might have been underway in the control subjects. Likewise in the patients, we do not know the exact timing and evolution of the underlying neurodegenerative process; so our timing is related to symptom onset.

Conclusion

Determining the levels of tau protein in the CSF could be regarded as a potential laboratory marker of the presence of neurodegeneration in PD patients. Higher clusterin CSF levels in PD patients demonstrate that during the neurodegeneration not only pro-apoptotic but also anti-apoptotic mechanisms are presented. Higher clusterin and tau CSF levels in PD patients with < 2 years of disease duration also support the hypothesis that the highest rate of degeneration is likely to occur in the early stage of disease.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD et al (1997) Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 69:1196–1203
- Arima K, Hirai S, Sunohara N, Aoto K, Izumiyama Y, Ueda K et al (1999) Cellular colocalization of phosphorylated tau- and NACP/alpha-synuclein-epitopes in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Res* 843:53–61
- Bibl M, Mollenhauer B, Esselmann H, Lewczuk P, Klafki HW, Sparbier K, Smirnov A, Cepek L, Trenkwalder C, Rütter E, Kornhuber J, Otto M, Wiltfang J (2006) CSF amyloid-beta-peptides in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. *Brain* 129(Pt 5):1177–1187 c
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U et al (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197–211
- Cookson MR, van der Brug M (2008) Cell systems and the toxic mechanism(s) of alpha-synuclein. *Exp Neurol* 209:5–11
- Espósito A, Dohm CP, Kermer P, Bähr M, Wouters FS (2007) alpha-Synuclein and its disease related mutants interact differentially with the microtubule protein tau and associate with the actin cytoskeleton. *Neurobiol Dis* 26:521–531
- Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM et al (2007) Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol* 64:343–349
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:181–184
- Jenner P, Olanow CW (2006) The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology* 66:S24–S36
- Mareš J, Stejskal D, Vavroušková J, Urbánek K, Herzig R, Hlušík P (2003) Use of cystatin C determination in clinical diagnostics.

- Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 147:177–180
- Marras C, Lang A (2008) Invited article: changing concepts in Parkinson disease: moving beyond the decade of the brain. *Neurology* 70(21):1996–2003
- McNaught KS, Olanow CW (2006) Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 27:530–545
- Molina JA, Benito-Leon J, Jimenez-Jimenez FJ et al (1997) Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of non-demented Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 238:139–141
- Mollenhauer B, Trenkwalder C, von Ahsen N, Bibl M, Steinacker P, Brechlin P et al (2006) Beta-amyloid 1–42 and tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 22(3):200–208
- Pucci S, Mazzarelli P, Missiroli F, Regine F, Ricci F (2008) Neuroprotection: VEGF, IL-6, and clusterin: the dark side of the moon. *Prog Brain Res* 173:555–573
- Sasaki K, Doh-ura K, Wakisaka Y, Iwaki T (2002) Clusterin/apolipoprotein J is associated with cortical Lewy bodies: immunohistochemical study in cases with alpha-synucleinopathies. *Acta Neuropathol* 104(3):225–230
- Schapira AH (2008) Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 7:97–109
- Stejskal D, Vavroušková J, Mareš J, Urbánek K (2005) Application of new laboratory marker assays in neurological diagnosis—a pilot study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 149(2):265–266
- Vranová H, Kaňovský P, Mareš J et al (2008) Laboratory markers of neurodegeneration in cerebrospinal fluid and degree of motor involvement in Parkinson's disease: a correlation study. *Cesk Slov Neurol N* 71/104(3):324–328
- Vranová H, Nevrlý M, Mareš J, Nestršil I, Stejskal D, Kaňovský P (2009) Neurodegenerative markers in cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. *Neurology* 72(11 Suppl.3):66
- Weintraub D, Comella CL, Horn S (2008) Parkinson's disease—part 1: pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *Am J Manag Care* 14(2 Suppl):S40–S48
- Yacoubian TA, Standaert DG (2009) Targets for Neuroprotection in Parkinson's Disease. *Biochim Biophys Acta* 1792(7):676–687

2.3 Hladiny tau proteinu a beta-amyloidu¹⁻⁴² v likvoru u jednotlivých klinických subtypů Parkinsonovy nemoci

Příkrylová Vranová H, Mareš J, Hlušík P, Nevrlý M, Stejskal D, Zapletalová J, Obereigneru R, Kaňovský P. Tau protein and beta-amyloid¹⁻⁴² CSF levels in different phenotypes of Parkinson's disease. J Neural Transm IF₂₀₁₀ **2,597 – přijato do tisku**

DOI: 10.1007/s00702-011-0708-4

Souhrn:

Další práce byla také zaměřena na vyšetření neurodegenerativních markerů tau proteinu a beta-amyloidu¹⁻⁴² v likvoru u pacientů s PN, ale tentokrát bylo vyšetření hladin těchto markerů provedeno u jednotlivých klinických subtypů PN. Je známo, že klinická manifestace PN je velmi heterogenní, a proto se již řada studií snažila či navrhovala rozdělení PN do jednotlivých podskupin právě podle dominující symptomatiky. Toto by mohlo vést k lepšímu pochopení patogeneze nemoci, zlepšení cílené terapie a zpřesnění predikce prognózy u pacientů s PN. Z navrhovaných dělení byla vybrána klasifikace, která byla vytvořena na základě klastrové analýzy v prospektivním klinickém sledování a následně byla použita v retrospektivní klinicko-patologické studii. Použití tohoto dělení při vyšetření mozkomíšního moku u těchto pacientů by mohlo tedy vyplnit jakýsi mezičlánek mezi „pouhým“ prospektivním klinickým sledováním na jedné straně a patologickým nálezem na straně druhé.

Pacienti s PN byly rozděleny do tří podskupin – onemocnění s časným začátkem (EDO), tremor dominantní forma PN (TD-PN) a non-tremor dominantní forma PN (NT-PN). U všech pacientů s PN, u kontrolní skupiny jednotlivců bez příznaků neurodegenerativního onemocnění a také u skupiny pacientů s Alzheimerovou demencí byly vyšetřeny hladiny neurodegenerativních markerů tau proteinu a beta-amyloidu¹⁻⁴² v likvoru.

U pacientů s NT-PN byly nalezeny signifikantně vyšší hladiny tau proteinu a indexu tau/beta₁₋₄₂ oproti ostatním podskupinám PN a také oproti kontrolní skupině. U pacientů s Alzheimerovou demencí byly nalezeny vyšší hladiny tau proteinu a indexu tau/beta a nižší hladiny beta-amyloidu₁₋₄₂ ve srovnání s kontrolní skupinou, dále oproti celému souboru pacientů s PN a také ve srovnání s podskupinou pacientů s EDO-PN a TD-PN. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl v hladinách tau proteinu a indexu tau/beta ve skupině pacientů s AD ve srovnání s pacienty s NT-PN, u beta-amyloidu₁₋₄₂ byla prokázána nižší hladina u pacientů s AD ve srovnání s NT-PN, signifikance však dosahovala jen hraniční hodnoty.

Výsledky této práce podporují názor, že tau protein pravděpodobně není striktně specifický protein pro detekci Alzheimerovy demence, ale mohl by sloužit jako potenciální laboratorní marker přítomnosti a tíže neurodegenerativního procesu, V souvislostech s rychlejší klinickou progresí onemocnění a rozsáhlejším neuropatologickým nálezem u pacientů s NT-PN, které byly již dříve publikovány, závěry této studie dále podporují roli stanovení hladiny tau proteinu v likvoru jako přínosného prognostického ukazatele.

Tau protein and beta-amyloid₁₋₄₂ CSF levels in different phenotypes of Parkinson's disease

Hana Přikrylová Vranová · Jan Mareš · Petr Hlušík ·
Martin Nevrlý · David Stejskal · Jana Zapletalová ·
Radko Obereigneru · Petr Kaňovský

Received: 3 January 2011 / Accepted: 20 August 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder with highly heterogeneous clinical manifestations. This fact has prompted many attempts to divide PD patients into clinical subgroups. This could lead to a better recognition of pathogenesis, improving targeted treatment and the prognosis of PD patients. The aim of the present study was to obtain cerebrospinal fluid (CSF) samples in PD patients and to search for a relationship between neurodegenerative CSF markers (tau protein, beta-amyloid₁₋₄₂ and index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂) and the clinical subtypes. PD patients were divided into three subgroups: early disease onset (EDO), tremor-dominant PD (TD-PD), and non-tremor dominant PD (NT-PD) according to the previously published classification. Neurodegenerative markers in the CSF were assessed in these three groups of patients suffering from PD (EDO-17, TD-15, NT-16 patients) and in a control group (CG) of 19 patients

suffering from non-degenerative neurological diseases and 18 patients with Alzheimer's disease (AD). The NT-PD patients were found to have significantly higher levels of CSF tau protein and index tau/beta than the control subjects and other Parkinsonian subgroups, but no significant differences in these markers were found between AD and NT-PD patients. In the context of more rapid clinical progression and more pronounced neuropathological changes in the NT-PD patient group, our results corroborate the opinion that CSF level of tau protein may be regarded as a potential laboratory marker of the presence and severity of neurodegeneration.

Keywords Parkinson's disease subgroups · Tau protein · Beta-amyloid₁₋₄₂ · Index tau/beta · CSF

Introduction

The clinical manifestation of Parkinson's disease (PD) is very heterogeneous. Many papers proposing the division of patients with PD into subgroups according to the clinical manifestation have been published (Graham and Sagar 1999; van Rooden et al. 2010, 2011; Rajput et al. 2009). In fact, the prospective and retrospective study and division of PD patients into these subgroups could lead to the better recognition of pathogenesis, thus improving targeted treatment and the prognosis of PD patients.

Because a definitive PD diagnosis is a "post-mortem" diagnosis, most studies focused on clinical manifestations of PD are retrospective (Jellinger 2008, 2009). But two prospective clinical studies have also used a cluster analysis of clinical data to divide patients into subgroups. The first prospective study was Graham et al., who divided PD patients into three subgroups: "motor only," "motor and

H. Přikrylová Vranová (✉) · J. Mareš · P. Hlušík ·
M. Nevrlý · P. Kaňovský
Department of Neurology, Faculty of Medicine and Dentistry,
Palacky University in Olomouc, University Hospital Olomouc,
I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic
e-mail: vranovaha@seznam.cz

D. Stejskal
Department of Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry,
Palacky University in Olomouc, University Hospital Olomouc,
Olomouc, Czech Republic

J. Zapletalová
Department of Medical Biophysics, Faculty of Medicine
and Dentistry, Palacky University in Olomouc,
Olomouc, Czech Republic

R. Obereigneru
Department of Psychology, Philosophical Faculty,
Palacky University in Olomouc, Olomouc, Czech Republic

Published online: 04 September 2011

 Springer

cognitive,” or “rapidly progressive” (Graham and Sagar 1999). But their inclusion of PD patients with advanced stages could lead to the masking of clinical manifestations and a resulting inaccurate division into subgroups.

Another prospective study of PD clinical manifestations and history was performed by Lewis et al. (2005). Only patients with an early stage of PD were included, hence eliminating the masking of clinical pictures. Cluster analysis of the main symptoms—motor and cognitive disturbances, severity of manifestation, disease duration and patient age—revealed four main subgroups: patients with an earlier disease onset; a tremor-dominant subgroup of patients; a non-tremor dominant subgroup with significant levels of cognitive impairment and mild depression; and a subgroup with a rapid disease progression but no cognitive impairment.

The division into four main subgroups employed in the Lewis et al. study was used in a retrospective clinico-pathological study by Selikhova et al. (2009). In their study, 242 patients with a pathologically verified PD diagnosis were included. Based on the clinical features and history, the patients were subdivided into four main subgroups, as defined in Lewis’s study. Patients with a primary initial diagnosis of dementia were excluded, meaning dementia at the time of diagnosis of PD or within 2 years of the first symptoms. Post-mortem evaluation detected a significantly higher occurrence of cortical Lewy bodies and beta-amyloid plaques in the non-tremor dominant subgroup of PD patients compared to the other subgroups. Moreover, dementia was significantly more common in the non-tremor dominant PD subgroup. The link between non-tremor dominant PD and cognitive impairment analogous to Lewis’s paper was demonstrated.

One of the main roles in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, including Parkinson’s disease, is played by specific proteins. Due to its close contact with brain tissue, cerebrospinal fluid (CSF) is a potential source of these markers of neurodegeneration in living patients. Proteomic studies indicate that more than 10% of identifiable proteins in CSF overlap with proteins detected in samples from the cortex of the frontal lobes collected during autopsies (Pan et al. 2007). On the other hand, in the same study more than 20% of proteins detected in the frontal cortex were detectable in CSF (Pan et al. 2007). Pathological changes typical for Alzheimer’s disease (AD) are a relatively frequent find in Parkinson’s patients (Mattila et al. 1998, Selikhova et al. 2009). Moreover, recent studies have shown *in vivo* that it is precisely alpha-synuclein that is involved in the regulation of tau protein phosphorylation and that during the mutation of alpha-synuclein associated with Parkinson’s disease, there is a stronger bond between alpha-synuclein and the tau protein, stimulating its phosphorylation and leading to the destabilization of

microtubules (Qureshi et al. 2011; Esposito et al. 2007). As a result of these conclusions, CSF markers, specifically tau protein, phosphorylated tau protein and beta-amyloid₁₋₄₂, which are more typical for AD, have been repeatedly studied in PD. Most of the published studies have shown that AD patients have higher levels of tau protein and phospho-tau protein, lower levels of beta-amyloid₁₋₄₂ and a higher tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ index (Sunderland et al. 2003; Mattsson et al. 2009). It is thought that CSF beta-amyloid₁₋₄₂ levels decrease in AD due to the aggregation of soluble extracellular beta-amyloid₁₋₄₂ peptides in neuritic plaques, while CSF tau protein and phospho-tau protein₁₈₁ levels increase due to their release from degenerating neurons (Hu et al. 2010). Furthermore, this “trio” is often studied in Parkinson’s patients with dementia (PDD) and in patients with dementia with Lewy bodies (DLB). With these diseases the aforementioned markers show, as opposed to the control group without cognitive deficit, similar changes as in AD (Bibl et al. 2006; Compta et al. 2009). A recent study showed that Parkinson’s patients have a lower level of beta-amyloid₁₋₄₂ in CSF, which is connected with a higher risk of developing cognitive deficit (Siderowf et al. 2010). Another study has shown that elevated levels of total tau protein versus phosphorylated tau protein in CSF are not exclusively specific to AD pathology (Hu et al. 2010). Elevated levels of total tau protein in CSF were found, e.g., following cranio-cerebral trauma (Ost et al. 2006; Blennow and Nellgård 2004) and during strokes (Yao et al. 2008). It is, therefore, thought that the level of total tau protein reflects an elevated release of the structural proteins from damaged axons, dendrites, synapses, and is related to cell death.

The aim of the present study was to obtain CSF samples from PD patients and to search for a relationship between neurodegenerative CSF markers (tau protein, beta-amyloid₁₋₄₂ and index tau/beta) and the clinical subtypes to highlight the potential of CSF analysis *in vivo* as a surrogate of post-mortem pathology. This would also support the relationship between non-tremor dominant PD and the development of cognitive impairment.

Patients and methods

Study group

The study was approved by the Institutional Ethics Committee, and all patients signed an informed consent. Only patients with early stage of PD without signs of dementia were included in the study. PD was diagnosed using the United Kingdom Parkinson’s Disease Society Brain Bank criteria (Hughes et al. 1992). Cognitive deficit was excluded by psychological assessment involving a battery tests to assess memory functions (memory span for auditory

working memory and Rey-Osterrieth complex figure for visual memory), attention (Trail Making Test), intelligence (WAIS-R) and executive functions [Trail Making Test (Spreen and Strauss 1998), Tower of Hanoi (Goel and Grafman 1995; Obereigner et al. 2010)]. Psychological examinations also included the mini mental status examination (MMSE), despite the fact that it is known to be insufficiently sensitive to subcortical cognitive deficits. CSF levels of tau protein and beta-amyloid₁₋₄₂ were measured in all patients.

Laboratory analysis and CSF sampling technique

The CSF samples were obtained by lumbar puncture performed under the usual sterile conditions, with the subjects sitting and the needle being inserted between lumbar vertebrae L4/L5. During each puncture, a total of 10 ml of CSF were collected in a sterile test tube. Subsequently, the CSF was morphologically assessed and centrifuged at 1,100g for 10 min at 4°C). Each sample was frozen to -80°C, and the concentrations of total tau protein (ELISA, Invitrogen, CA, USA) and beta-amyloid₍₁₋₄₂₎ (ELISA, In-nogenetics, Belgium) were measured with the Biorobot DSX analyser (Dynex, USA) for all subjects in the series within 10 weeks of freezing. The analytical characteristics of all ELISA methods were satisfactory when verifying the manufacturers' data (both repeatability and reproducibility <9%). At the same time, the CSF tau protein/beta-amyloid₍₁₋₄₂₎ ratio was calculated for all the patients (Stejskal et al. 2005).

Tau protein

We measured the total soluble tau protein using ELISA sandwich (IVD-CE). Samples were diluted with a dilution buffer 1:1 (50 + 50 µl).

Sensitivity

The minimum detectable dose of tau was <12 ng/L. This was determined by adding two standard deviations to the mean OD obtained when the zero standard was assayed 30 times.

The concentration range of the calibration curve used was 12–2,000 ng/L.

Precision

Intra-assay precision (coefficients of variation, CV) was under 5.2%. Inter-assay precision (CV) was under 7.8%.

Linearity of dilution

Human CSF and a tissue culture medium containing 10% fetal calf serum were spiked with tau and serially diluted in standard diluted buffer over the range of the assay. Linear regression analysis of samples versus the expected concentration yielded a correlation coefficient of 0.99 in both cases.

Recovery

The recovery of tau added to human CSF averaged 94%.

Specificity

Buffered solutions of a panel of substances at 20 000 ng/L were assayed and found to have no cross-reactivity: beta-amyloid₁₋₄₀, beta-amyloid₁₋₄₂, alpha-synuclein, beta synuclein.

Beta-amyloid₁₋₄₂

We measured beta-amyloid₁₋₄₂ with ELISA sandwich (IVD-CE, solid-phase ELISA in with the amyloid peptide is captured by a first monoclonal antibody. CSF samples are added and incubated with a biotinylated antibody. This complex is then detected by a peroxidase-labeled streptavidin. Samples were not diluted.

Sensitivity

The minimum detectable dose of beta-amyloid₁₋₄₂ was <87 ng/L. This was determined by adding two standard deviations to the mean OD obtained when the zero standard was assayed 30 times.

Concentration range of the calibration curve used was 125–2,000 ng/L.

Precision

Intra-assay precision (CV) was under 3%. Inter-assay precision (CV) was under 4.1%.

Linearity of dilution

Human CSF were spiked with beta-amyloid₁₋₄₂ and serially diluted in standard diluted buffer over the range of the assay. When the calculated concentrations were plotted against the obtained undiluted concentrations, no deviations from linearity could be observed.

Recovery

The recovery of beta-amyloid₁₋₄₂ added to human CSF averaged 96%.

Specificity

Buffered solutions of a panel of substances at 10,000 ng/L were measured and found to have no cross-reactivity: beta-amyloid₁₋₄₃, beta-amyloid₁₋₃₈, beta-amyloid₁₋₃₉, beta-amyloid₁₋₄₀, beta-amyloid₂₋₄₂, and beta-amyloid₈₋₄₃.

Division of the PD group into subgroups

Patients suffering from PD were divided according to Lewis's study in which PD patients are finally divided into four subgroups: patients with an early disease onset; a tremor dominant subgroup of patients, a non-tremor dominant subgroup and patients with rapid disease progression without dementia. The subgroups were defined as follows (Lewis et al. 2005):

1. Earlier disease onset (EDO): disease onset below the age of 55 years.
2. Tremor dominant (TD): aged 55 years and over at onset; rest tremor as sole initial symptom or sustained dominance of tremor over bradykinesia and rigidity.
3. Non-tremor dominant (NT): aged 55 years and over at onset; predominantly bradykinetic motor features with no or only mild rest tremor.

In the present study, only patients with a relatively early phase of the disease were included, mostly with disease duration of less than 5 years; therefore, no patients met the criteria for inclusion in the fourth subgroup as defined by Lewis et al. (2005)—patients with rapid disease progression. This classification was chosen because, as was mentioned above, most patients included in this study suffered from an early stage of PD and usually had one main dominant symptom. Therefore, the quite common mixture type published, e.g., by Rajput et al. (2009), was not detected in a corresponding number.

To evaluate the studied parameters, the CSF analysis results were compared between the PD patient subgroups and the control group of subjects without neurodegenerative disease (CG) and the control group of patients suffering from AD. In the PD patient subgroups, the values of the studied parameters were then compared with the severity of motor impairment as staged by the Hoehn and Yahr (HY) scale (Hoehn and Yahr 1967) and with treatment. We decided to use the HY scale instead of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale-Part III (UPDRS-III) because UPDRS-III values change depending on

the time of day and medication, and we, therefore, did not consider them relevant for this CSF analysis.

Statistical analysis

SPSS software version 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. To determine differences between the PD patient group and the control groups as well as those in the subgroups of patients with PD and AD, a Chi-square test or Fisher's exact test for categorical variables and the Mann-Whitney test with Bonferroni correction for metric parameters were used. The dependence between metric parameters and the HY scale was assessed by the non-parametric Spearman's rank correlation analysis. Due to the multiple comparisons, the level of significance was adjusted using Bonferroni correction so that the first type of error did not exceed a value of 0.05. The calculated significance value was, therefore, compared to the corrected borderline significance level $\alpha = 0.05/10$, in which $n = 10$ is the number of tests performed. Tests with a precisely calculated significance level of $p < 0.005$ were considered statistically significant.

Results

A total of 48 patients suffering from PD without signs of dementia were examined: 17 with EDO-PD, 15 with TD-PD and 16 with NT-PD. The group of 17 patients with EDO-PD contains 6 females and 11 males aged 29–55 years, with a mean age of 48.9 ± 6.78 years, a mean age of onset of 46.47 ± 6.17 and mean disease duration of 3.32 ± 2.65 . Thirteen (76.5%) of the 17 patients with EDO-PD manifested as TD-PD. The mean HY score was 1.59 ± 0.67 ; 6 of these patients were treated with a levodopa equivalent dose (LED) with a mean of 541.7 ± 249 mg per day. The group of 15 TD-PD contains 8 females and 7 males aged 56–75 years, with a mean age of 67.3 ± 6.38 years, a mean age of onset of 64.96 ± 5.38 and mean disease duration of 2.93 ± 2.07 . The mean HY score was 1.87 ± 0.59 ; 5 of these patients were treated; the LED mean was 600.0 ± 216.8 . The group of 16 patients with NT-PD contains 9 females and 7 males aged 57–73 years, with a mean age of 65.62 ± 5.16 years, a mean age of disease onset of 62.5 ± 5.3 , a mean disease duration of 3.25 ± 3.19 and a mean HY score of 1.78 ± 0.56 . Five of these patients were treated; LED mean was 590.0 ± 120.0 .

The control group without signs of neurodegenerative disease (CG) comprised 19 patients: 8 females and 11 males aged 33–79, with a mean age of 56.16 ± 11.48 years. Of these, 11 patients had vertebrogonic disease and 8 patients had psychogenic disease.

For comparative purposes, a group of 18 patients with AD was also used (15 females and 3 males aged 56–79, with a mean age of 68.44 ± 9.24 years, a mean age of disease onset of 66.5 ± 7.65 , a mean disease duration of 2.5 ± 1.06).

The comparison of demographic data in the four subgroups showed that the genders are equally represented in the subgroups, but that the age of CG was significantly lower than in TD-PD ($p = 0.004$), NT-PD ($p = 0.005$) and in AD ($p = 0.005$). Among PD patients, those with early-onset of PD were significantly younger than TD-PD ($p < 0.0001$) and NT-PD ($p < 0.0001$).

No differences in disease duration and the severity of manifestation scored by the HY scale were found among all Parkinsonian subgroups.

CSF marker levels in different subject groups are illustrated in Figs. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and in Table 1.

The NT-PD patients were found to have significantly higher levels of CSF tau protein ($p < 0.0001$) and index of tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ ($p < 0.0001$) than the CG. Significantly higher tau protein was found in patients with NT-PD compared to EDO-PD ($p = 0.0002$) and TD-PD ($p = 0.001$) (Fig. 1). A higher index of tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ was also found in patients with NT-PD compared to EDO-PD ($p = 0.0006$) and TD-PD ($p = 0.002$) (Fig. 2). CSF levels of beta-amyloid₁₋₄₂ were found to be lower in NT-PD patients than in the other investigated

subgroups, but the differences did not quite reach statistical significance (EDO vs. NT, $p = 0.105$; TD vs. NT, $p = 0.069$) (Fig. 3).

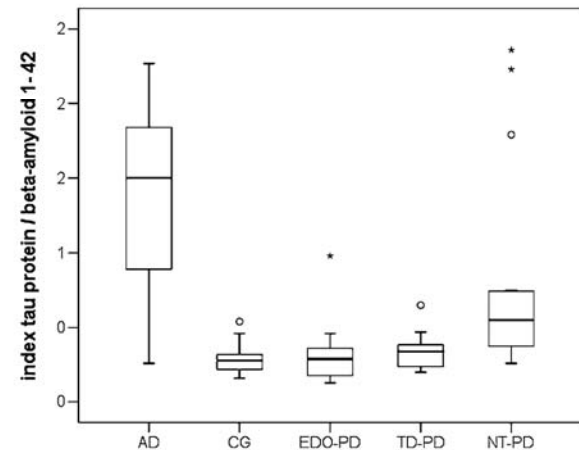


Fig. 2 Comparison of index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ (index tau/beta) levels in the control subject (CG), Alzheimer's disease (AD) and Parkinsonian subgroups using the Mann–Whitney test with Bonferroni correction. Significantly higher index tau/beta CSF levels were found in NT-PD patients compared to the CG ($p < 0.0001$), EDO-PD ($p = 0.0006$) and TD-PD ($p = 0.002$). Significantly higher index tau/beta CSF levels were found in AD patients compared to CG ($p < 0.0001$), EDO-PD ($p < 0.0001$) and TD-PD ($p < 0.0001$). No differences of index tau/beta CSF level were found between AD and NT-PD ($p = 0.01$)

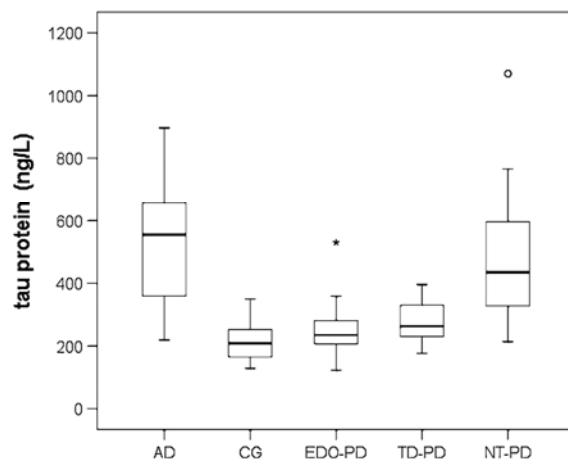


Fig. 1 Comparison of tau protein (ng/L) levels in the control subject (CG), Alzheimer's disease (AD) and Parkinsonian subgroups using the Mann–Whitney test with Bonferroni correction. NT-PD patients showed significantly higher tau protein CSF levels compared to the CG ($p < 0.0001$), EDO-PD ($p = 0.0002$) and TD-PD ($p = 0.001$). Significantly higher tau protein CSF levels compared to CG ($p < 0.0001$), EDO-PD ($p < 0.0001$) and TD-PD ($p = 0.0001$) were found in AD patients. No differences of tau protein CSF level were found between AD and NT-PD ($p = 0.214$)

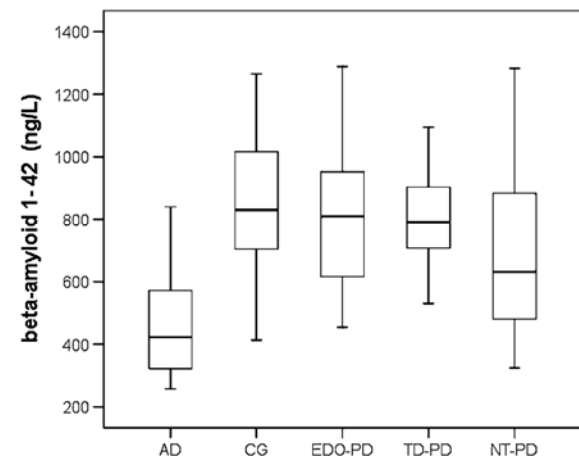


Fig. 3 Comparison of beta-amyloid₁₋₄₂ (ng/L) levels in the control subject (CG), Alzheimer's disease (AD) and Parkinsonian subgroups using the Mann–Whitney test with Bonferroni correction. Lower beta-amyloid₁₋₄₂ CSF levels were found in NT-PD patients compared to the CG ($p = 0.064$), EDO-PD ($p = 0.105$) and TD-PD ($p = 0.069$), but the differences did not quite reach statistical significance. Significantly lower beta-amyloid₁₋₄₂ CSF levels were found in AD patients compared to CG ($p < 0.0001$), EDO-PD ($p < 0.0001$), TD-PD ($p = 0.0001$), but with borderline significance compared to NT-PD ($p = 0.0052$)

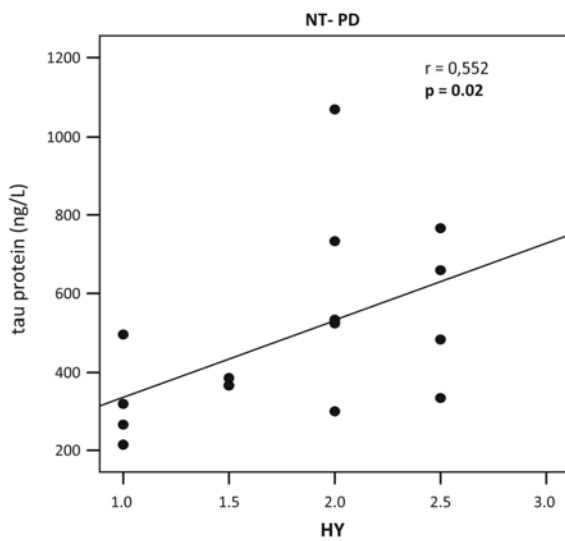


Fig. 4 The relationship between the severity of motor impairment in NT-PD patients as measured by the Hoehn and Yahr scale (H-Y) and the CSF levels of tau protein assessed by non-parametric Spearman's rank correlation analysis

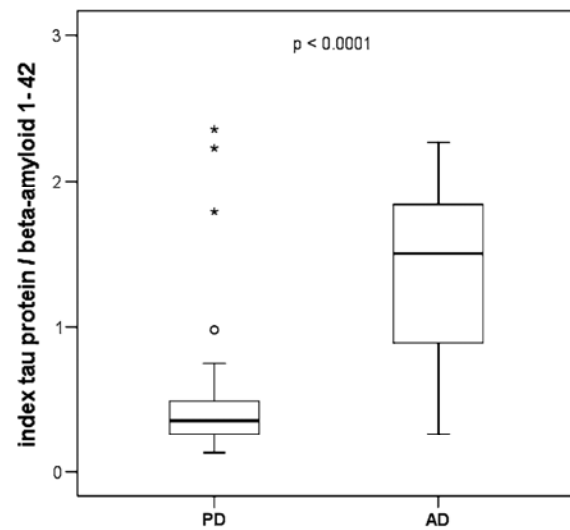


Fig. 6 Comparison of index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ levels in Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) using the Mann-Whitney test. The AD patients were found to have significantly higher levels of CSF index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ than all PD patients ($p < 0.0001$)

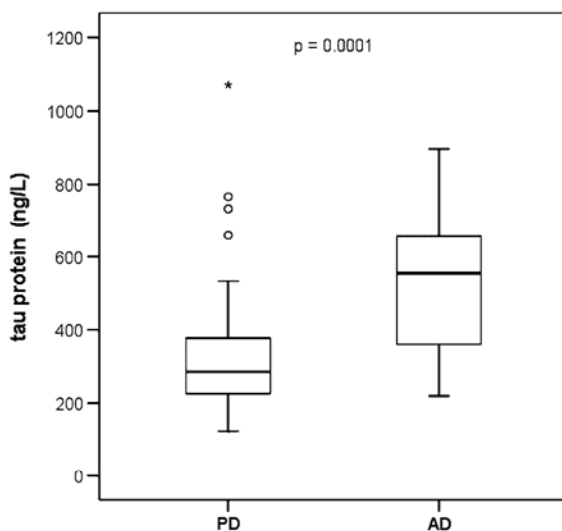


Fig. 5 Comparison of tau protein levels (ng/L) in Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) using the Mann-Whitney test. The AD patients were found to have significantly higher levels of CSF tau protein than all PD patients ($p = 0.0001$)

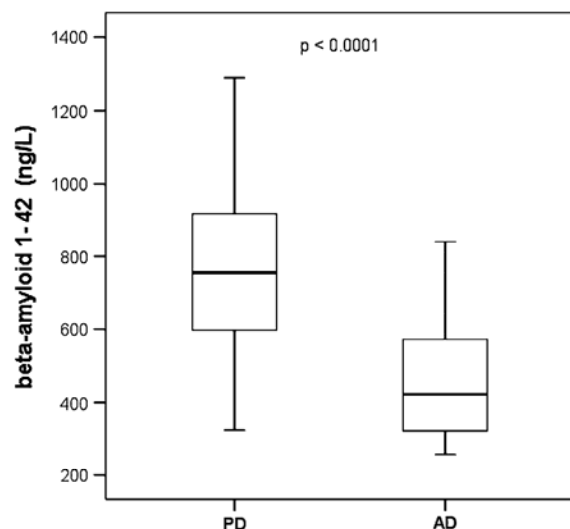


Fig. 7 Comparison of beta-amyloid₁₋₄₂ (ng/L) levels in Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) using the Mann-Whitney test. The AD patients were found to have significantly lower levels of CSF beta-amyloid₁₋₄₂ than all PD patients ($p < 0.0001$)

Furthermore, a close relationship between tau protein CSF levels and the severity of motor manifestation scored by the HY scale ($p = 0.02$) in NT-PD patients was found (Fig. 4.). No other correlation of tau protein and beta-amyloid₁₋₄₂ was determined between the duration of the disease and treatment.

The AD patients were found to have significantly higher levels of CSF tau protein ($p < 0.0001$ resp. $p = 0.0001$), index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ ($p < 0.0001$ resp. $p < 0.0001$) and lower levels of CSF beta-amyloid₁₋₄₂ ($p < 0.0001$ resp. $p < 0.0001$) than the CG and also than all patients with PD. The following results were found

Table 1 CSF levels of tau protein, beta-amyloid₁₋₄₂ and index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ of the study groups

	CG	EDO-PD	TD-PD	NT-PD	AD
CSF tau protein (ng/L)	209.0 ± 66.6	235.0 ± 88.8	263.0 ± 69.6	435.0 ± 224.9	554.5 ± 187.4
median ± SD (range)	(129.0–350.0)	(123.0–530.0)	(177–396)	(214–1,070)	(220–897)
CSF beta-amyloid ₁₋₄₂ (ng/L)	829.7 ± 257.4	809.5 ± 236.8	790.7 ± 167.6	630.7 ± 269.4	422.6 ± 165.3
median ± SD (range)	(413.6–1,264.6)	(454.5–1,288.4)	(530.4–1,094.5)	(324.3–1,282.6)	(257.5–840.1)
Index tau protein/beta-amyloid ₁₋₄₂	0.28 ± 0.099	0.29 ± 0.198	0.34 ± 0.116	0.55 ± 0.683	1.50 ± 0.598
median ± SD (range)	(0.16–0.54)	(0.13–0.98)	(0.20–0.65)	(0.26–2.36)	(0.36–2.27)

SD stadard deviation

during a comparison of CSF levels of neurodegenerative markers among AD patients and PD subgroups: significantly higher levels of tau protein in AD patients compared to EDO-PD ($p < 0.0001$) and TD-PD ($p = 0.0001$), but not NT-PD ($p = 0.214$); significantly higher levels of index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ compared to EDO-PD ($p < 0.0001$) and TD-PD ($p < 0.0001$), but not TD-PD ($p = 0.01$); and significantly lower levels of beta-amyloid₁₋₄₂ compared to EDO-PD ($p < 0.0001$) and TD-PD ($p < 0.0001$), but borderline significance of TD-PD ($p = 0.0052$; Figs. 1, 2, 3 and 5, 6, 7).

Discussion

In this prospective study, some differences in CSF markers of neurodegeneration in PD subgroups were found. PD patients were subdivided into subgroups on clinical grounds according to the classification system based on a previous cluster analysis (Lewis et al. 2005). Higher CSF tau protein levels and higher index of tau/beta were found in patients with NT-PD compared to the other Parkinsonian subgroups. CSF levels of tau protein also showed a close relationship with severity of motor manifestation scored by the HY scale.

CSF levels showed no differences of tau protein and index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ between AD patients and NT-PD patients, but lower CSF levels of beta-amyloid₁₋₄₂ with borderline significance were found in AD patients compared to NT-PD patients.

Typical clinical manifestations of PD may include tremor, rigidity, akinesia and postural instability. In the early stage, one main symptom dominates the clinical image, and this one often persists as the main symptom up to the advanced stage (Williams and Lees 2009). During disease progression, additional symptoms such as gait disturbances or cognitive impairment change the clinical presentation mask the original main symptom and in the end, the PD clinical image may broaden to that of atypical Parkinsonian syndrome.

To study PD pathogenesis and progression, it is advantageous to reduce the clinical heterogeneity by dividing

patients with PD on the one hand according to their main common symptoms (Burn et al. 2006; Lyros et al. 2008) or on the other hand according to their post-mortem pathological findings and their retrospective comparison with disease history (Buter et al. 2008, Paulus and Jellinger 1991). A combination of both approaches is presented in a longitudinal clinical follow-up and autopsy study published by Rajput et al. in 2009.

The more recent study by Lewis et al. (2005) used a data-driven cluster analysis to divide PD patients into four subgroups. The results of this study confirmed the existence of distinct subgroups of patients in the early clinical stages of PD. This study also demonstrated a significantly higher occurrence of cognitive impairment in patients the NT-PD subgroup.

Lewis's division of PD was used by the retrospective clinicopathological study by Selikhova et al. The previously observed clinical association of the NT-PD form and cognitive impairment was strengthened by the post-mortem finding of significantly higher mean pathological grading of cortical Lewy bodies and pathology characteristics for AD in the brains of NT-PD patients (Selikhova et al. 2009).

A third alternative approach to evaluating and validating PD subtypes is to complement the information on clinical features with in vivo analysis of CSF markers of neurodegeneration. Out of the many studied CSF markers of neurodegeneration, only a few have generally shown clinical significance. Tau protein and beta-amyloid₁₋₄₂ are well-recognized markers typical for neurodegenerative diseases, especially for diseases with signs of dementia (Alves et al. 2010; Okonkwo et al. 2010; Compta et al. 2009).

Under normal conditions, tau protein contributes to the integrity of the cytoskeleton. Its excessive phosphorylation, as in the case of numerous neurodegenerative diseases including PD, results in impaired cell integrity, loss of its physiological function and even cell death (Lee et al. 2001). The inclusion of tau protein is found with alpha-synuclein as a part of Lewy bodies in patients with PD (Selkoe 2004; Clinton et al. 2010; Waxman and Giasson 2011). Increased levels of tau protein in the CSF are found in patients with AD and PD patients with dementia (Rajput

et al. 2006; Clinton et al. 2010; Jellinger et al. 2002; Arima et al. 1999; Esposito et al. 2007). Increased CSF level of tau protein was also found in PD patients with disease duration of less than 2 years, which probably reflects the idea that most neurodegenerative changes occur in the initial stage of the disease (Přikrylová Vranová et al. 2010).

Beta-amyloid is generated from the amyloid precursor protein (APP). APP is cleaved either by alpha-secretase to produce sAPP, assumed to have neuroprotective effects, or by beta-amyloid cleaving enzyme, i.e., by beta-secretase and subsequently by gamma-secretase, producing beta-amyloid₄₀ and beta-amyloid₁₋₄₂. These aggregate to form the core of neuritic plaques. A cascade of other processes follows, including oxidative stress, cytotoxic effects and inflammatory response, resulting in neuronal death and development of dementia. Decreased levels of beta-amyloid in the CSF are also found in individuals with AD or PD patients with dementia (Bibl et al. 2006; Lashley et al. 2008; Mollenhauer et al. 2006; Fagan et al. 2007).

Prior to the study, we speculated that CSF levels of neurodegenerative markers may also change in PD patients without signs of dementia and that this potential alteration might be useful as a prognostic marker. Therefore, we decided to exclude PD patients with dementia.

As mentioned above, both higher CSF levels of tau protein and lower levels of beta-amyloid₁₋₄₂ were previously reported in PD patients with dementia. However, in a more recent study, only lower CSF levels of beta-amyloid₁₋₄₂ and not higher CSF levels of tau protein were demonstrated as a specific marker and predictor of cognitive impairment in PD patients (Siderowf et al. 2010). In the present study, markers among AD, CG and all PD patients were also compared, and significantly higher CSF levels of tau protein and index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ and lower levels of beta-amyloid₁₋₄₂ were found in AD patients, which is in agreement with the majority of previously published studies (Bibl et al. 2006). No differences of statistical significance between CSF levels of tau protein and index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂, and lower CSF levels of beta-amyloid₁₋₄₂ with borderline significance were found in AD patients compared to NT-PD patients.

We may, therefore, speculate that tau protein probably reveals the degree of neurodegeneration, whereas beta-amyloid₁₋₄₂ is a more specific marker of cognitive impairment. This role of tau protein would be supported by the close relationship between tau protein CSF levels and the severity of PD manifestation scored by the HY scale observed in the present study.

In a similar manner, we interpreted the results of our previous study (Přikrylová Vranová et al. 2010), in which higher CSF levels of tau protein were found in PD patients with disease duration of less than 2 years. More extensive neurodegeneration in NT-PD patients may also be deduced

from the findings of more severe progression of the disease course (Rajput et al. 2006) and more severe post-mortem cortical Lewy body pathology reported by Selikhova et al. On the other hand, these findings may also indicate the presence of Alzheimer's pathology in the NT-PD subgroup from an early stage of the disease.

With ongoing disease progression, it is likely that accumulating pathology will over time lead to the development of a manifest cognitive deficit in this patient group. To corroborate this suggestion, we need to include more patients in the study and follow-up our NT-PD patients further with repeated clinical and neuropsychological testing at yearly intervals. Alternatively, the follow-up may also document progression of disease or changing clinical presentation, resulting in a change of the original PD diagnosis.

Conclusion

In this prospective study, a higher CSF level of tau protein and index tau/beta were found in NT-PD patients compared to other Parkinsonian subgroups. In AD patients, higher CSF levels of tau protein and index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ and lower CSF levels of beta-amyloid₁₋₄₂ compared to CG, to all PD and to EDO-PD and TD-PD patients were found. No differences were found between CSF levels of tau protein and index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ in AD patients compared to NT-PD patients, but lower CSF levels of beta-amyloid₁₋₄₂ with borderline statistical significance were found in AD patients compared to NT-PD patients. These findings probably corroborate the opinion that tau protein is not a strictly specific marker for AD, but that it may be regarded as a potential laboratory marker of the presence and severity of neurodegeneration, which could be also used as an auxiliary prognostic indicator.

Acknowledgments The study was supported by grant IGA MHCZ NT1222-5/2010.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Alves G, Brønnick K, Aarsland D, Blennow K, Zetterberg H, Ballard C et al (2010) CSF amyloid- β and tau proteins, and cognitive performance, in early and untreated Parkinson's Disease: the Norwegian ParkWest study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81:1080–1086
- Arima K, Hirai S, Sunohara N, Aoto K, Izumiyama Y, Ueda K et al (1999) Cellular co-localization of phosphorylated tau- and NACP/alpha-synuclein-epitopes in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Res* 843:53–61

- Bibl M, Mollenhauer B, Esselmann H, Lewczuk P, Klafki HW, Sparbier K et al (2006) CSF amyloid-beta-peptides in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. *Brain* 129:1177–1187
- Blennow K, Nellgård B (2004) Amyloid beta 1-42 and tau in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *Neurology* 62(1):159–160
- Burn DJ, Rowan EN, Allan LM, Molloy S, O'Brien JT, McKeith IG (2006) Motor subtype and cognitive decline in Parkinson's disease with dementia, and dementia with Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:585–589
- Buter TC, van den Hout A, Matthews FE, Larsen JP, Brayne C, Aarsland D (2008) Dementia and survival in Parkinson's disease. *Neurology* 70:1017–1022
- Clinton LK, Blurton-Jones M, Myczek K, Trojanowski JQ, LaFerla FM (2010) Synergistic Interactions between Abeta, tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline. *J Neurosci* 30:7281–7289
- Compta Y, Martí MJ, Ibarretxe-Bilbao N, Junqué C, Valldeoriola F, Muñoz E et al (2009) Cerebrospinal tau, phospho-tau, and beta-amyloid and neuropsychological functions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 24:2203–2210
- Esposito A, Dohm CP, Kermer P, Bähr M, Wouters FS (2007) Alpha-Synuclein and its disease-related mutants interact differentially with the microtubule protein tau and associate with the actin cytoskeleton. *Neurobiol Dis* 26:521–531
- Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM et al (2007) Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol* 64:343–349
- Goel V, Grafman J (1995) Are the frontal lobes implicated in 'planning' functions? Interpreting data from the Tower of Hanoi. *Neuropsychologia* 33:623–642
- Graham JM, Sagar HJ (1999) A data-driven approach to the study of heterogeneity in idiopathic Parkinson's disease: identification of three distinct subtypes. *Mov Disord* 14:10–20
- Hoehn MM, Yahr MD (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17(5):427–442
- Hu WT, Chen-Plotkin A, Arnold SE, Grossman M, Clark CM, Shaw LM et al (2010) Biomarker discovery for Alzheimer's disease, frontotemporal lobar degeneration, and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 120(3):385–399
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:181–184
- Jellinger KA (2008) Neuropathological aspects of Alzheimer disease, Parkinson disease and frontotemporal dementia. *Neurodegener Dis* 5:118–121
- Jellinger KA (2009) A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim Biophys Acta* 1792:730–740
- Jellinger KA, Seppi K, Wenning GK, Poewe W (2002) Impact of coexistent Alzheimer pathology on the natural history of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 109:329–339
- Lashley T, Holton JL, Gray E, Kirkham K, O'Sullivan SS, Hilbig A et al (2008) Cortical alpha-synuclein load is associated with amyloid-beta plaque burden in a subset of Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol* 115:417–425
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24:1121–1159
- Lewis SJ, Foltynie T, Blackwell AD, Robbins TW, Owen AM, Barker RA (2005) Heterogeneity of Parkinson's disease in the early clinical stages using a data driven approach. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:343–348
- Lyros E, Messinis L, Papathanasopoulos P (2008) Does motor subtype influence neurocognitive performance in Parkinson's disease without dementia? *Eur J Neurol* 15:262–267
- Mattila PM, Koskela T, Røyttä M, Lehtimäki T, Pirttilä TA, Ilveskoski E et al (1998) Apolipoprotein E epsilon4 allele frequency is increased in Parkinson's disease only with co-existing Alzheimer pathology. *Acta Neuropathol* 96(4):417–420
- Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M et al (2009) CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 302(4):385–393
- Mollenhauer B, Trenkwalder C, von Ahsen N, Bibl M, Steinacker P, Brechlin P et al (2006) Beta-amyloid 1-42 and tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 22:200–208
- Obereigner R, Obereigner K, Cakirpaloglu S, Reiterova E, Kanovsky P (2010) Tower of Hanoi and the new administration rules for effective executive functions diagnostics. *Eur J Neurol* 17(Suppl 3):482
- Okonkwo OC, Alosco ML, Griffith HR, Mielke MM, Shaw LM, Trojanowski JQ et al (2010) Cerebrospinal fluid abnormalities and rate of decline in everyday function across the dementia spectrum: normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 67:688–696
- Ost M, Nylén K, Csajbok L, Ohrfelt AO, Tullberg M, Wikkelsö C et al (2006) Initial CSF total tau correlates with 1-year outcome in patients with traumatic brain injury. *Neurology* 67(9):1600–1604
- Pan S, Shi M, Jin J, Albin RL, Lieberman A, Gearing M et al (2007) Proteomics identification of proteins in human cortex using multidimensional separations and MALDI tandem mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics* 6(10):1818–1823
- Paulus W, Jellinger K (1991) The neuropathological basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 50:743–755
- Příkrýlová Vranová H, Mareš J, Nevrlý M, Zapletalová J, Hlušík P, Kaňovský P (2010) CSF markers of neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 117:1177–1181
- Qureshi HY, Paudel HK (2011) Parkinsonian neurotoxin MPTP and alpha-synuclein mutations promote tau protein phosphorylation at Ser262 and destabilize microtubule cytoskeleton in vitro. *J Biol Chem* 286(7):5055–5068
- Rajput A, Dickson DW, Robinson CA, Ross OA, Dächsel JC, Lincoln SJ et al (2006) Parkinsonism, Lrrk2 G2019S, and tau neuropathology. *Neurology* 67:1506–1508
- Rajput AH, Voll A, Rajput ML, Robinson CA, Rajput A (2009) Course in Parkinson disease subtypes: a 39-year clinicopathologic study. *Neurology* 73:206–212
- Selikhova M, Williams DR, Kempster PA, Holton JL, Revesz T, Lees AJ (2009) A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. *Brain* 132:2947–2957
- Selkoe DJ (2004) Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol* 6(11):1054–1061
- Siderowf A, Xie SX, Hurtig H, Weintraub D, Duda J, Chen-Plotkin A et al (2010) CSF amyloid {beta}₁₋₄₂ predicts cognitive decline in Parkinson disease. *Neurology* 75(12):1055–1061
- Spreen O, Strauss E (1998) A compendium of neuropsychological tests, 2nd edn. Oxford University Press, New York
- Stejskal D, Vavroušková J, Mareš J, Urbánek K (2005) Application of new laboratory marker assays in neurological diagnosis—a pilot study. *Biomed Pap* 149:265–267
- Sunderland T, Linker G, Mirza N, Putnam KT, Friedman DL, Kimmel LH et al (2003) Decreased beta-amyloid₁₋₄₂ and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 289(16):2094–2103

- van Rooden SM, Heiser WJ, Kok JN, Verbaan D, van Hilten JJ, Marinus J (2010) The identification of Parkinson's disease subtypes using cluster analysis: a systematic review. *Mov Disord* 25(8):969–978
- van Rooden SM, Colas F, Martínez-Martín P, Visser M, Verbaan D, Marinus J et al (2011) Clinical subtypes of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26(1):51–58
- Waxman EA, Giasson BI (2011) Induction of intracellular tau aggregation is promoted by α -synuclein seeds and provides novel insights into the hyperphosphorylation of tau. *J Neurosci* 31(21):7604–7618
- Williams DR, Lees AJ (2009) How do patients with parkinsonism present? A clinicopathological study. *Intern Med J* 39(1):7–12
- Yao C, Williams AJ, Ottens AK, May Lu XC, Chen R et al (2008) Detection of protein biomarkers using high-throughput immunoblotting following focal ischemic or penetrating ballistic-like brain injuries in rats. *Brain Inj* 22(10):723–732

3 Diskuze

První část samotného výzkumu předkládané práce je zaměřena na vyšetření neurodegenerativních markerů u pacientů s PN bez příznaků demence a jejich korelace s délkou trvání nemoci a tíží motorického postižení.

Nejprve byly u pacientů s PN bez příznaků demence a u kontrolní skupiny subjektů bez příznaků neurodegenerativního onemocnění vyšetřeny hladiny tau proteinu, beta-amyloidu₁₋₄₂ a cystatinu C v likvoru. Hladiny markerů byly dále u pacientů s PN korelovány s délkou trvání nemoci a tíží motorického postižení. V použitém souboru pacientů s PN byla nalezena vyšší hladina tau proteinu oproti kontrolní skupině. Ve skupině pacientů s PN byla dále prokázána vyšší hladina tau proteinu u podskupiny pacientů s PN s délkou trvání nemoci méně než 2 roky oproti podskupině s délkou trvání nemoci více než 2 roky. Nebyla prokázána korelace hladin tau proteinu s tíží motorického postižení vyjádřené pomocí škály Hoehnové a Yahra (H &Y). Ostatní sledované parametry nevykázaly žádnou další korelaci.

V další analýze byly u všech subjektů s PN a u kontrolní skupiny vyšetřeny hladiny tau proteinu, beta-amyloidu₁₋₄₂, cystatinu C a clusterinu v likvoru. Pacienti s PN byly stejně jako v předchozí analýze rozděleny do dvou podskupin dle délky trvání nemoci (do 2 let a více než 2 roky). V použitém souboru byly opět nalezeny vyšší hladiny tau proteinu v likvoru u pacientů s PN oproti kontrolní skupině, dále byly taktéž nalezeny vyšší hladiny tau proteinu u pacientů s PN s délkou trvání nemoci méně než 2 roky. Obdobné výsledky, tedy vyšší hladiny u PN oproti kontrolní skupině a dále u PN s délkou trvání nemoci méně než 2 roky byly nalezeny i u clusterinu. Nebyla prokázána žádná další korelace mezi ostatními parametry. Následná analýza tedy potvrdila výsledky první analýzy, i když byl v druhém případě lehce pozměněn soubor pacientů s PN a byla rozšířena kontrolní skupina. Navíc výsledky analýzy clusterinu podporují hypotézu, že neurodegenerativní proces u PN pravděpodobně probíhá nejintenzivněji v počátečních stádiích onemocnění a dále svědčí o přítomnosti jak pro-apoptotických, tak anti-apoptotických mechanismů.

Z uvedených výsledků tedy vyplývá, že tau protein by mohl u PN hrát roli nespecifického markeru tíže či intenzity probíhajícího neurodegenerativního procesu.

Proč byli k analýze vybrány právě tyto markery je uvedeno již v předchozí kapitole (viz. kap. 1.3.3).

Nejvíce diskutovaným tématem však určitě bylo dělení pacientů dle délky trvání nemoci s hranicí dva roky. Původně byla zamýšlena korelace hladin neurodegenerativních markerů v likvoru s délkou trvání nemoci za užití Spearmanovy korelační analýzy. Malý soubor pacientů a nerovnoměrné rozložení hodnot však toto neumožňovalo. Proto jsme byli nuceni k bližšímu rozboru pacientů, kdy se pacienti rozdělili do dvou podskupin: pacienti s počátečním stádiem onemocnění a pacienti s pokročilejším stádiem onemocnění s hranicí právě dva roky. Toto bylo způsobeno přirozeným přísunem pacientů, kteří jsou do specializovaného centra odesíláni buď s podezřením na PN k přesnější diagnostice nebo s již pravděpodobnou diagnózou PN, ale nedostatečnou kompenzací při terapii zprostředkované mimo specializované centrum.

Dále bylo často dotazováno, jak je možné určit začátek onemocnění, když neurodegenerativní proces probíhá vždy určitou dobu asymptomaticky. Tzv. preklinické stadium si samozřejmě uvědomujeme, je však společné pro mnoho onemocnění a to nejen nervové soustavy. Proto jsme se rozhodli za začátek onemocnění určit dobu, kdy pacient popisuje rozvoj prvních příznaků souvisejících s PN.

Již mnoho prací bylo publikováno na téma vyšetření beta-amyloidu₁₋₄₂, tau proteinu a fosfo-tau proteinu u PN, dosud však v ojedinělých pracech byly tyto hladiny korelovány s délkou trvání nemoci či tíží motorického postižení (Shi et al.2011). Výsledky studie při analýze beta-amyloidu₁₋₄₂ se shodují s výsledky většiny studií, které u kognitivně intaktních jedinců s PN neprokazují rozdíly oproti kontrolní skupině (Holmberg et al.2003; Lins et al.2004; Mollenhauer et al.2006; Verbeek et al.2004; Zhang et al.2008). Nižší hladiny jsou v recentních pracích nalezeny u pacientů s PN s vyšším UPDRS skóra (Shi et al.2011) a spojovány s vyšším rizikem rozvoje kognitivního deficitu (Siderowf et al.2010). Beta-amyloid₁₋₄₂ by tedy mohl hrát roli jeho potenciálního prediktivního faktoru (Siderowf et al.2010). U

hladin tau proteinu sledovaných v likvoru pacientů s PN jsou výsledky studií spíše inkonzistentní. Jsou práce, které prokazují nižší hladiny tau proteinu u pacientů s PN oproti kontrolní skupině (Shi et al.2011), většina publikovaných prací však signifikantní rozdíl neprokázala (Alves et al.2010). Vyšší hladiny tau proteinu jsou většinou nalézány u pacientů s PN s příznaky kognitivního deficitu (Compta et al.2011; Montine et al.2010). Není dosud jasné vysvětlení, co způsobuje tyto diskrepance. Je však nutno podotknout, že uvedené práce jsou provedeny na poměrně malém souboru pacientů, vždy kolem 20-30 pacientů.

Další část samotného výzkumu předkládané práce je zaměřena na vyšetření neurodegenerativních markerů v likvoru u jednotlivých podskupin pacientů s PN bez příznaků demence a jejich rozdíly mezi jednotlivými klinickými podskupinami.

Z navrhovaných dělení byla vybrána klasifikace, která byla vytvořena na základě klastrové analýzy v prospektivním klinickém sledování (Lewis et al.2005) a následně byla použita v retrospektivní klinicko-patologické studii (Selichova et al.2009). Pacienti s PN byli tedy rozděleni do tří podskupin – onemocnění s časným začátkem (EDO), tremor dominantní forma PN (TD-PN) a non-tremor dominantní forma PN (NT-PN). U všech pacientů s PN, u kontrolní skupiny subjektů bez neurodegenerativního postižení a také u skupiny pacientů s Alzheimerovou demencí byly vyšetřeny hladiny neurodegenerativních markerů tau proteinu a beta-amyloidu₁₋₄₂ v likvoru. U pacientů s NT-PN byly nalezeny signifikantně vyšší hladiny tau proteinu a indexu tau/beta₁₋₄₂ oproti kontrolní skupině a také oproti ostatním podskupinám PN. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl v hladinách tau proteinu mezi skupinou pacientů s AD a NT-PN, u pacientů s AD byly nalezena nižší hladiny beta-amyloidu₁₋₄₂ oproti NT-PN, rozdíl však dosahoval jen hraniční signifikance.

Použitá klastrová analýza však ve skutečnosti dělila pacienty s PN do čtyř podskupiny, čtvrtou podskupinu tvořili pacienti s rychlou progresí onemocnění bez příznaků demence (rapid disease progression – RDP). U pacientů zařazených do této podskupiny vykazovala PN rychlou progresi motorického deficitu bez příznaků demence s úmrtím v souvislosti s PN do 10-ti let od stanovení diagnózy. Vzhledem k tomu, že prezentovaná práce zahrnovala

pouze pacienty v počátečním stádiu onemocnění s délkou trvání obtíží do 6 let, nesplnil žádný subjekt kritéria zařazení do této podskupiny.

V již zmíněné práci Lewise et al., kde byli pacienti s PN rozděleni dle klinické manifestace do čtyř podskupin (EDO-PN, TD-PN, NT-PN, RDP-PN), byl u pacientů s NT-PN prokázán signifikantně častější výskyt kognitivního deficitu a rychlejší progrese onemocnění, která však nedosahovala statisticky významného rozdílu. V klinicko-patologické studii Selichové et al., kdy byla použita stejná klasterová analýza, byl u pacientů s NT-PN prokázán rozsáhlejší neuropatologický nálezn, podporující výsledky Lewise et al.. Předkládaná práce měla za cíl zjistit, zda i v mozkomíšním moku jsou přítomny obdobné změny mezi podskupinami PN, obzvláště zda jsou přítomny změny hladiny neurodegenerativních markerů typických pro demence (tau protein a beta-amyloid₁₋₄₂) u pacientů s NT-PN dosud bez příznaků kognitivního deficitu. Již řada publikovaných prací prokázala vyšší hladiny tau proteinu, nižší hladiny beta-amyloidu₁₋₄₂ a vyšší hodnoty indexu tau/beta u pacientů s PN s demencí (PDD) (Buongiorno et al. 2011). Recentní práce navíc uvádějí, že průkaz nižší hladiny beta-amyloidu₁₋₄₂ v CSF u dosud kognitivně intaktních jedinců by mohl sloužit jako prediktivní faktor kognitivního postižení (Siderowf et al.2010). V použitém souboru byly u pacientů s NT-PN prokázány nižší hladiny beta-amyloidu₁₋₄₂ oproti CG a ostatním podskupinám PN, rozdíly však nedosahovaly statistické významnosti. Tento výsledek může být způsoben malým počtem vyšetřených pacientů a rozšíření souboru v následujícím sledování by pomohlo k potvrzení či vyvrácení výše zmíněné hypotézy, tedy že nižší hladiny beta-amyloidu₁₋₄₂ v CSF by mohly sloužit jako prediktivního faktoru rozvoje kognitivního deficitu.

Některé práce však uvádí, že i izolované zvýšení hodnoty indexu tau/beta svědčí pro přítomnost patologie typické pro kognitivní postižení (Mareš et al.2009; Leverenz et al.2010). Nutno však podotknout, že pacienti byli v době vyšetření bez příznaků kognitivního deficitu. Lze tedy i toto zvýšení považovat za prediktivní faktor demence?

Vyšší hladiny tau proteinu bývají nalézány u tzv. parkinson-plus syndromů (Aerts et al.2010; Süßmuth et al.2010) či u pacientů po cévních mozkových příhodách jako marker tíže postižení nervové soustavy (Yao et al.2008). U pacientů s NT-PN je popisována rychlejší

progrese onemocnění a také je popsán rozsáhlejší neuropatologický nález oproti ostatním podskupinám. V těchto souvislostech by tedy bylo možné považovat vyšší hladiny tau proteinu jako negativní prognostický marker postižení nervové soustavy.

4 Závěr

Vyšetření mozkomíšního moku hraje v diferenciální diagnostice neurologických onemocnění důležitou roli. Na poli diferenciální diagnostiky neurodegenerativních onemocnění však ale stále spadá spíše do oblasti výzkumu, a vyjma vyšetření tau proteinu a beta-amyloidu1-42 u demencí, nepatří vyšetření neurodegenerativních markerů v likvoru u těchto onemocnění k běžně užívaným.

Parkinsonova nemoc je jedním z nejčastějších neurodegenerativních onemocnění a z celé plejády těchto nemocí je také asi nejpřesněji diagnostikována. Dosud ale není zcela jasná dynamika patogenetického neurodegenerativního procesu a ani není znám ukazatel, který by vyjadřoval tíži či intenzitu neurodegenerace. Právě mozkomíšní mok se vzhledem ke svému těsnému kontaktu s mozkovou tkání jeví jako potenciální zdroj markerů neurodegenerace u žijících pacientů. Specifické proteiny hrají jednu z hlavních rolí v patogenezi PN, a proto se stanovení hladin těchto proteinů v mozkomíšním moku jeví jako slibný ukazatel neurodegenerace.

V první části výzkumu jsme prokázali ve dvou pracích signifikantně vyšší hladiny tau proteinu a clusterinu u pacientů s PN oproti kontrolní skupině a dále v podskupině pacientů s PN jsme navíc prokázaly vyšší hladiny tau proteinu a clusterinu u pacientů s délkou trvání nemoci do 2 let oproti trvání nemoci více než 2 roky. Výsledky svědčí o možném přínosu stanovení hladiny tau proteinu u pacientů s PN jako markeru přítomnosti, resp. tíže neurodegenerativního procesu. Dále výsledky ukazují, že neurodegenerativní proces u PN probíhá pravděpodobně nejintenzivněji v počátečních stádiích onemocnění. Tuto hypotézu podporuje i přítomnost signifikantně vyšších hladin clusterinu, které navíc svědčí o přítomnosti obranných antiapoptotických mechanismů.

V druhé části výzkumu jsme sledovali hladiny tau proteinu a beta-amyloidu1-42 u pacientů s PN, kteří byli rozděleni do třech klinických subtypů: PN s časným začátkem (EDO), ne-tremor dominantní forma (NT-PN) a tremor dominantní forma (TD-PN). Ve

sledované skupině pacientů s PN jsme prokázali signifikantně vyšší hladiny tau proteinu a indexu tau/beta u pacientů s NT-PN oproti kontrolní skupině a také oproti ostatním klinickým subtypům PN. Při srovnání markerů u pacientů s Alzheimerovou demencí (AD) byly nalezeny vyšší hladiny tau proteinu a indexu tau/beta a nižší hladiny beta-amyloidu $_{1-42}$ oproti celému souboru pacientů s PN a také ve srovnání s podskupinou pacientů s EDO-PN a TD-PN. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl v hladinách tau proteinu a indexu tau/beta ve skupině pacientů s AD ve srovnání s pacienty s NT-PN, u beta-amyloidu $_{1-42}$ byla prokázána nižší hladina u pacientů s AD ve srovnání s NT-PN, signifikance však dosahovala jen hraniční hodnoty

V souvislostech s rychlejší klinickou progresí onemocnění a rozsáhlejším neuropatologickým nálezem u pacientů s NT-PN, které byly již dříve publikovány, závěry této části studie podporují roli stanovení tau proteinu v likvoru jako potenciálního laboratorního ukazatele přítomnosti a tíže neurodegenerativního procesu.

Výsledky celé práce tedy svědčí o možném přínosu stanovení hladiny tau proteinu u pacientů s PN jako pravděpodobně nespecifickém markeru přítomnosti, resp. tíže či intenzity neurodegenerativního procesu, který v širších souvislostech může přispět k predikci průběhu onemocnění.

5. Souhrn

5.1 Souhrn český

Parkinsonova nemoc (PN) je jedním z nejčastějších neurodegenerativních onemocnění a z celé plejády těchto nemocí je také asi nejpřesněji diagnostikována. Dosud ale není zcela jasná dynamika neurodegenerativního procesu a ani není znám ukazatel, který by vyjadřoval tíž či intenzitu neurodegenerace. Mozkomíšní mok se vzhledem ke svému těsnému kontaktu s mozkovou tkání jeví jako potenciální zdroj markerů neurodegenerace u žijících pacientů. Specifické proteiny hrají jednu z hlavních rolí v patogenezi PN, a proto se stanovení hladin těchto proteinů v mozkomíšním moku jeví jako slibný ukazatel neurodegenerace. Cílem souboru předkládaných prací bylo vyšetření neurodegenerativních markerů v likvoru u pacientů s PN a nalezení případné korelace jejich hladin s délkou trvání nemoci, tíží motorického postižení či rozdílů mezi jednotlivými klinickými podtypy.

V první části práce byly neurodegenerativní markery tau protein, beta-amyloid₁₋₄₂, index tau/beta, cystatin c resp. clusterin stanoveny u dvou souborů pacientů s PN bez příznaků demence a u kontrolní skupiny (CG). Tyto hladiny byly srovnávány mezi pacienty s PN a subjekty CG, v podskupině pacientů trpících PN byly navíc korelovány s tíží motorického postižení vyjádřeného stupnicí dle Hoehnové a Yahra, a dále srovnávány u podskupiny pacientů s délkou trvání nemoci méně než 2 roky (PN1) a více než 2 roky (PN2). V obou použitých souborech byly prokázány signifikantně vyšší hladiny tau proteinu u pacientů s PN oproti CG ($p=0,05$ resp. $0,045$), a taktéž u pacientů s délkou trvání nemoci do 2 let oproti déle trvání více než 2 roky ($p=0,03$ resp. $0,033$). V případě druhého souboru vykazovaly hladiny clusterinu stejnou tendenci jako tau protein, tedy vyšší hladiny u PN oproti CG ($p=0,004$) a u PN1 oproti PN2 ($p=0,044$). Ostatní sledované parametry nevykázaly žádnou další signifikantní korelaci. Výsledky by mohli svědčit o přínosu stanovení tau proteinu v likvoru

jako potenciálního markeru přítomnosti či tíže neurodegenerativního procesu a dále vyššími hladinami clusterinu poukazují na spoluúčast regeneračních mechanismů.

V druhé části práce byly hladiny neurodegenerativních markerů stanoveny u pacientů s PN, kteří byly rozděleni do tří klinických subtypů: PN s časným začátkem (EDO-PN) tremor dominantní forma (TD-PN) a non-tremor dominantní forma (NT-PN) a dále u kontrolní skupiny bez neurodegenerativního onemocnění (CG) a u pacientů s Alzheimerovou demencí (AD). Byly zjištěny signifikantně vyšší hladiny tau proteinu a indexu tau/beta u NT-PN oproti CG ($p < 0.0001$ resp. $p < 0.0001$), a také oproti ostatním subtypům PN (EDO-PN vs. NT-PN $p = 0.0002$ resp. $p = 0.001$; TD-PN vs. NT-PN $p = 0.001$ resp. $p = 0.002$). Při srovnání markerů u pacientů s Alzheimerovou demencí (AD) byly nalezeny vyšší hladiny tau proteinu a indexu tau/beta a nižší hladiny beta-amyloidu 1-42 oproti celému souboru pacientů s PN a také ve srovnání s podskupinou pacientů s EDO-PN a TD-PN. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl v hladinách tau proteinu a indexu tau/beta ve skupině pacientů s AD ve srovnání s pacienty s NT-PN, u beta-amyloidu 1-42 byla prokázána nižší hladina u pacientů s AD ve srovnání s NT-PN, signifikance však dosahovala jen hraniční hodnoty. V souvislostech s rychlejší klinickou progresí onemocnění a rozsáhlejším neuropatologickým nálezem u pacientů s NT-PN, které byly již dříve publikovány, závěry této části studie podporují roli stanovení tau proteinu v likvoru jako potenciálního laboratorního ukazatele přítomnosti a tíže neurodegenerativního procesu.

Výsledky celé práce tedy svědčí o možném přínosu stanovení hladiny tau proteinu u pacientů s PN jako pravděpodobně nespecifickém markeru přítomnosti, resp. tíže či intenzity neurodegenerativního procesu, který v širších souvislostech může přispět k predikci průběhu onemocnění.

5.2 Summary

Parkinson's disease is one of the most common neurodegenerative disorder and also one of the most correctly diagnosed. But the disease prognosis and also markers of severity and course of neurodegeneration are still unclear. Cerebrospinal fluid is in close contact with brain tissue and therefore it seems to be a potential source of these markers during the patients' life. Specific proteins play one of the main roles in pathogenesis of PD and assessment of these proteins in the CSF could provide potential markers of neurodegeneration.

The aim of the presented studies was the assessment of neurodegenerative markers in the CSF in patients with PD and finding correlation of their CSF levels with disease duration, severity of motor impairment and differences among clinical subtypes.

In the first part of the presented work, the neurodegenerative markers tau protein, beta-amyloid₁₋₄₂, index tau/beta, cystatin C and clusterin were assessed in two groups of PD patients without signs of dementia and in a control group (CG). These CSF levels were compared between PD patients and CG, in subgroups of PD patients, they were additionally correlated with the severity of motor impairment assessed by Hoehn and Yahr score and also compared between PD patients with disease duration less than 2 years (PD1) and more than 2 years (PD2). In both studied groups, significantly higher levels of tau protein were found in PD vs. CG ($p=0.05$ resp. 0.045), and also in PD patients with disease duration less than 2 years vs. more than 2 years ($p=0.03$ resp. 0.033). In the second group, significantly higher level of clusterin were found in PD vs. CG ($p=0.004$) and in PD1 vs. PD2 ($p=0.044$). No correlations were found among other neurodegenerative markers and the diagnosis, disease duration and severity of motor impairment. These results suggest that tau protein could serve as potential marker of presence or severity of the neurodegenerative process and higher levels of clusterin indicate the presence of regenerative mechanism.

PD patients were divided into three subgroups – early disease onset (EDO), tremor-dominant PD (TD-PD) and non-tremor dominant PD (NT-PD) according to a previously

published classification. Neurodegenerative markers in the CSF were assessed in these three groups of patients suffering from PD (EDO: 17, TD: 15, NT: 16 patients) and in a control group (CG) of 19 patients suffering from non-degenerative neurological diseases and 18 patients with Alzheimer's dementia (AD).

In this prospective study, a higher CSF level of tau protein and index tau/beta were found in NT-PD patients compared to other Parkinsonian subgroups. In AD patients, higher CSF levels of tau protein and index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ and lower CSF levels of beta-amyloid₁₋₄₂ compared to CG, to all PD and to EDO-PD and TD-PD patients were found. No differences were found between CSF levels of tau protein and index tau protein/beta-amyloid₁₋₄₂ in AD patients compared to NT-PD patients, but lower CSF levels of beta-amyloid₁₋₄₂ with borderline statistical significance were found in AD patients compared to NT-PD patients. These findings probably corroborate the opinion that tau protein is not a strictly specific marker for AD, but that it may be regarded as a potential laboratory marker of the presence and severity of neurodegeneration, and could be also used as an auxiliary prognostic indicator.

6 Literatura

Adam P, Nekola P, Zeman D, Sobek O, Kelbich P, Arnoštová L et al. (1998) Rutinní diagnostické možnosti cytologie mozkomíšního moku. Ověření návrhu klasifikace cytologických nálezů, klinický přínos a meze používaných metodik. *Klin Biochem Metab* 4: 258-265.

Aerts MB, Esselink RA, Bloem BR, Verbeek MM. (2011) Cerebrospinal fluid tau and phosphorylated tau protein are elevated in corticobasal syndrome. *Mov Disord.* Jan;26(1):169-73.

Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD et al. (1997) Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem.* 69: 1196–1203.

Alves G, Larsen JP, Emre M, Wentzel-Larsen T, Aarsland D. (2006) Changes in motor subtype and risk for incident dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord.* Aug; 21 (8): 1123-30.

Alves G, Brønneck K, Aarsland D, Blennow K, Zetterberg H, Ballard C et al. (2010) CSF amyloid- β and tau proteins, and cognitive performance, in early and untreated Parkinson's Disease: the Norwegian ParkWest study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 81: 1080-6

Ambler Z, Bednařík J, Růžička E et al. *Klinická neurologie.* Praha: Triton; 2004.

Andersson M, Zetterberg H, Minthon L, Blennow K, Londos E. (2011) The cognitive profile and CSF biomarkers in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. *Int J Geriatr Psychiatry.* Jan; 26 (1)

Arima K, Hirai S, Sunohara N, Aoto K, Izumiyama Y, Ueda K et al. (1999) Cellular co-localization of phosphorylated tau- and NACP/alpha-synuclein-epitopes in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Res.* 843: 53–61.

Barzilai A. (2010) DNA damage, neuronal and glial cell death and neurodegeneration. Apoptosis. Nov; 15 (11): 1371-81.

Bednařík J., Ambler Z., Růžicka e. et al. Klinická neurologie. Triton 2010

Bibl M, Mollenhauer B, Esselmann H, Lewczuk P, Klafki HW, Sparbier K et al. (2006) CSF amyloid-beta-peptides in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia. Brain. 129: 1177-87.

Blennow K, Nellgård B. (2004) Amyloid beta 1-42 and tau in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. Neurology. Jan 13; 62 (1): 159-160

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. (2006) Alzheimer disease. Lancet 368:387–403.

Borroni B, Gardoni F, Parnetti L, Magno L, Malinverno M et al. (2009) Pattern of Tau forms in CSF is altered in progressive supranuclear palsy. Neurobiol Aging. Jan; 30 (1): 34-40.

Borroni B, Malinverno M, Gardoni F, Alberici A, Parnetti L, Premi E et al. (2008) Tau forms in CSF as a reliable biomarker for progressive supranuclear palsy. Neurology. Nov 25; 71 (22): 1796-803.

Boström F, Hansson O, Blennow K, Gerhardsson L, Lundh T, Minthon L et al. (2009) Cerebrospinal fluid total tau is associated with shorter survival in dementia with Lewy bodies. Dement Geriatr Cogn Disord. 28 (4): 314-9.

Buongiorno M, Compta Y, Martí MJ. (2011) Amyloid- β and τ biomarkers in Parkinson's disease-dementia. J Neurol Sci. Jul 15. [Epub ahead of print]

Burn DJ, Rowan EN, Allan LM, Molloy S, O'Brien JT, McKeith IG. (2006) Motor subtype and cognitive decline in Parkinson's disease with dementia, and dementia with Lewy bodies. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 77: 585–9.

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, et al. (2006) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiology of Aging. 24: 197-211.

Bugiani O, Murrell JR, Giaccone G, Hasegawa M, Ghigo G, Tabaton M et al. (1999) Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. J Neuropathol Exp Neurol. Jun; 58 (6): 667-77.

Buter TC, van den Hout A, Matthews FE, Larsen JP, Brayne C, Aarsland D. (2008) Dementia and survival in Parkinson's disease. *Neurology*. 70: 1017–22.

Casseron W, Genton P. (2005) DOPA-sensitive dystonia-plus syndrome. *Dev Med Child Neurol*. Mar; 47 (3): 200-3.

Clinton LK, Blurton-Jones M, Myczek K, Trojanowski JQ, LaFerla FM. (2010) Synergistic Interactions between Abeta, tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline. *J Neurosci*. 30: 7281-9.

Comi C, Carecchio M, Chiocchetti A, Nicola S, Galimberti D, Fenoglio C, Cappellano G, Monaco F, Scarpini E, Dianzani U. (2010) Osteopontin is increased in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and its levels correlate with cognitive decline. *J Alzheimers Dis*. 19 (4): 1143-8.

Compta Y, Martí MJ, Ibarretxe-Bilbao N, Junqué C, Valldeoriola F, Muñoz E et al. (2009) Cerebrospinal tau, phospho-tau, and beta-amyloid and neuropsychological functions in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 24: 2203-10.

Cookson MR, van der Brug M. (2008) Cell systems and the toxic mechanism (s) of alpha-synuclein. *Exp Neurol*. 209: 5–11.

Dayanandan R, Van Slegtenhorst M, Mack TG, Ko L, Yen SH, Leroy K et al. (1999) Mutations in tau reduce its microtubule binding properties in intact cells and affect its phosphorylation. *FEBS Lett*. Mar 12; 446 (2-3): 228-32.

DeLegge MH, Smoke A. (2008) Neurodegeneration and inflammation. *Nutr Clin Pract*. Feb; 23 (1): 35-41.

Delisle MB, Murrell JR, Richardson R, Trofatter JA, Rascol O, Soulaiges X et al. (1999) A mutation at codon 279 (N279K) in exon 10 of the Tau gene causes a tauopathy with dementia and supranuclear palsy. *Acta Neuropathol*. Jul; 98 (1): 62-77.

Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G et al. (1995) Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem*. Mar 31; 270 (13): 7679-88.

Esposito A, Dohm CP, Kermer P, Bähr M, Wouters FS. (2007) alpha-Synuclein and its disease-related mutants interact differentially with the microtubule protein tau and associate with the actin cytoskeleton. *Neurobiol Dis.* 26: 521-31

Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM et al. (2007) Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid (42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol.* 64: 343-9.

Fagan AM, Holtzman DM. (2010) Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomark Med.* Feb; 4 (1): 51-63.

Gendron TF, Petrucelli L. (2009) The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* Mar 11; 4: 13.

Geser F, Wenning GK, Seppi K et al. (2006) Progression of multiple system atrophy (MSA): a prospective natural history study by the European MSA study group (EMSA SG). *Mov Disord.* 21: 179-86.

Gilman S, Wenning GK, Low PA et al. (2008) Second consensus statement on diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 71: 670-76

Goedert M. (2004) Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* 15: 45-9

Graham JM, Sagar HJ. (1999) A data-driven approach to the study of heterogeneity in idiopathic Parkinson's disease: identification of three distinct subtypes. *Mov Disord.* 14: 10–20.

Higgins GC, Beart PM, Shin YS, Chen MJ, Cheung NS, Nagley P. (2010) Oxidative stress: emerging mitochondrial and cellular themes and variations in neuronal injury. *J Alzheimers Dis.* 2010; 20 Suppl 2: S453-73.

Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Wszolek Z, Reed L, Miller BI et al. (1998) Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science.* Dec 4; 282 (5395): 1914-7.

Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 55: 181–4.

Hutton M., Lendon CL., Rizzu P., Baker M., Froelich S., Houlde H., et al. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393: 702-5

Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*. Dec 17; 360 (6405): 674-7.

Jellinger KA. (2008) Neuropathological aspects of Alzheimer disease, Parkinson disease and frontotemporal dementia. *Neurodegener Dis*. 5: 118-21.

Jellinger KA. (2009) A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim Biophys Acta*. 1792: 730-40

Jellinger KA, Seppi K, Wenning GK, Poewe W. (2002) Impact of coexistent Alzheimer pathology on the natural history of Parkinson's disease. *J Neural Transm*. 109: 329-39

Jellinger KA. (2010) Interaction between α -synuclein and tau in Parkinson's disease comment on Wills et al.: elevated tauopathy and α -synuclein pathology in postmortem Parkinson's disease brains with and without dementia. *Exp Neurol* 225: 210-218. *Exp Neurol*. 2011 Jan; 227 (1): 13-8.

Jenner P, Olanow CW. (2006) The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology*. 66: 24-S36.

Keller O, Koukolík F, Rusina R, Matěj R. Neurodegenerace. Pracovní skupina pro diagnostiku a studium neurodegenerativních onemocnění. 2004. Dostupné z URL: <http://www.neurodegenerace.cz/odbor.htm>.

Lashley T, Holton JL, Gray E, Kirkham K, O'Sullivan SS, Hilbig A, et al. (2008) Cortical alpha-synuclein load is associated with amyloid-beta plaque burden in a subset of Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol*. 115: 417-25.

Lee G, Neve RL, Kosik KS. (1989) The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron*. Jun; 2 (6): 1615-24.

Leoni V. (2011) The effect of apolipoprotein E (ApoE) genotype on biomarkers of amyloidogenesis, tau pathology and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Clin Chem Lab Med*. 49(3):375-83.

- Lewis SJ, Foltynie T, Blackwell AD, Robbins TW, Owen AM, Barker RA. (2005) Heterogeneity of Parkinson's disease in the early clinical stages using a data driven approach. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 76: 343–48.
- Li C, Zhao R, Gao K, Wei Z, Yin MY, Lau LT, Chui D, Hoi Yu AC.(2011) Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. Feb 1; 8 (1): 67-80
- Ling H, O'Sullivan SS, Holton JL, Revesz T, Massey LA, Williams DR et al. (2010) Does corticobasal degeneration exist? A clinicopathological re-evaluation. *Brain*. Jul; 133 (Pt 7): 2045-57.
- Lu M, Kosik KS. (2001) Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Mol Biol Cell*. Jan; 12 (1): 171-84.
- Lyros E, Messinis L, Papathanasopoulos P. (2008) Does motor subtype influence neurocognitive performance in Parkinson's disease without dementia? *Eur J Neurol*. 15: 262–7.
- Marras C, Lang A. (2008) Invited article: changing concepts in Parkinson disease: moving beyond the decade of the brain. *Neurology*. 70 (21): 1996-2003
- Martínez A, Portero-Otin M, Pamplona R, Ferrer I. (2010) Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates. *Brain Pathol*. Mar; 20 (2): 281-97.
- Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M et al. (2009) CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA*. Jul 22; 302 (4): 385-93.
- May S, Gilman S, Sowell BB, et al. (2007) Potential outcome measures and trial design issues for multiple system atrophy. *Mov. Disord*, 22: 2371-77
- McNaught KS, Olanow CW. (2006) Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 27: 530-545.
- Molina JA, Benito-Leon J, Jimenez-Jimenez FJ et al. (1997) Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of non-demented Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*. 238: 139-41.

Mollenhauer B, Trenkwalder C, von Ahsen N, Bibl M, Steinacker P, Brechlin P et al. (2006) Beta-amyloid 1-42 and tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 22: 200-8

Mollenhauer B, Förstl H, Deuschl G, Storch A, Oertel W, Trenkwalder C. (2010) Lewy body and parkinsonian dementia: common, but often misdiagnosed conditions. *Dtsch Arztebl Int*. Oct;107(39):684-91.

Nagaishi M, Yokoo H, Nakazato Y. (2010) Tau-positive glial cytoplasmic granules in multiple system atrophy. *Neuropathology*. 2011 Jun;31(3):299-305

Nacharaju P, Lewis J, Easson C, Yen S, Hackett J, Hutton M et al. (1999) Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. *FEBS Lett*. Mar 26; 447 (2-3): 195-9.

Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res*. Dec; 387 (3): 271-80.

Okonkwo OC, Alosco ML, Griffith HR, Mielke MM, Shaw LM, Trojanowski JQ et al. (2010) Cerebrospinal fluid abnormalities and rate of decline in everyday function across the dementia spectrum: normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 67: 688-96.

Ost M, Nylén K, Csajbok L, Ohrfelt AO, Tullberg M, Wikkelsö C et al. (2006) Initial CSF total tau correlates with 1-year outcome in patients with traumatic brain injury. *Neurology*. Nov 14; 67 (9): 1600-4

Pabon MM, Bachstetter AD, Hudson CE, Gemma C, Bickford PC. (2011) CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. Jan 25; 8 (1): 9.

Papapetropoulos S, Ellul J, Argyriou AA, Talelli P, Chroni E, Papapetropoulos T. (2004) The effect of vascular disease on late onset Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. Apr; 11 (4): 231-5.

Paulus W, Jelliger K. (1991) The neuropathological basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 50: 743-55.

Poorkaj P, Muma NA, Zhukareva V, Cochran EJ, Shannon KM, Hurtig H et al. (2002) An R5L tau mutation in a subject with a progressive supranuclear palsy phenotype. *Ann Neurol.* Oct; 52 (4): 511-6.

Přikrylová Vranová H, Mareš J, Nevrlý M, Zapletalová J, Hlušík P, Kaňovský P. (2010) CSF markers of neurodegeneration in Parkinson's disease *J Neural Transm.* 117: 1177-81

Pucci S, Mazzarelli P, Missiroli F, Regine F, Ricci F. (2008) Neuroprotection: VEGF, IL-6, and clusterin: the dark side of the moon. *Prog Brain Res.* 173: 555–73.

Quinn N, Critchley P, Marsden CD. (1987) Young onset Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2 (2): 73-91.

Qureshi HY, Paudel HK. (2011) Parkinsonian neurotoxin MPTP and alpha-synuclein mutations promote tau protein phosphorylation at Ser262 and destabilize microtubule cytoskeleton in vitro. *J Biol Chem.* 286(7):5055-68.

Rajput A, Dickson DW, Robinson CA, Ross OA, Dächsel JC, Lincoln SJ et al. (2006) Parkinsonism, Lrrk2 G2019S, and tau neuropathology. *Neurology.* 67: 1506-8

Rajput AH, Voll A, Rajput ML, Robinson CA, Rajput A. (2009) Course in Parkinson disease subtypes: A 39-year clinicopathologic study. *Neurology.* 73: 206-12.

Růžička E. (2006) Parkinsonova nemoc. *Čes. a slov. Neurol. Neurochir.*, 69/102, 2006, No. 4, p. 241–258.

Růžička E., Roth J., Kaňovský P. et al. Parkinsonova nemoc a parkinsonské syndromy. *Extrapyramidová onemocnění I.* Galén, 2000.

Sasaki K, Doh-ura K, Wakisaka Y, Iwaki T. (2002) Clusterin/apolipoprotein J is associated with cortical Lewy bodies: immunohistochemical study in cases with alpha-synucleinopathies. *Acta Neuropathol.* 104 (3): 225-30.

Schapira AH. (2008) Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 7: 97–109.

Sawada M, Imamura K, Nagatsu T. (2006) Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* (70): 373-81.

Selikhova M, Williams DR, Kempster PA, Holton JL, Revesz T, Lees AJ. (2009) A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. *Brain*. 132: 2947-57.

Shimode K, Kobayashi S, Imaoka K, Umegae N, Nagai A. (1996) Leukoencephalopathy-related cerebral amyloid angiopathy with cystatin C deposition. *Stroke* Aug; 27 (8): 1417-9.

Siderowf A, Xie SX, Hurtig H, Weintraub D, Duda J, Chen-Plotkin A, Shaw LM, Van Deerlin V, Trojanowski JQ, Clark C. (2010) CSF amyloid {beta} 1-42 predicts cognitive decline in Parkinson disease. *Neurology*. Sep 21; 75 (12): 1055-61.

Srulljes K, Mallien G, Bauer S, Dietzel E, Gröger A, Ebersbach G et al. (2011) In vivo comparison of Richardson's syndrome and progressive supranuclear palsy-parkinsonism. *J Neural Transm*. 2011 Aug;118(8):1191-7.

Stefanova N, Bucke F, Duerr S, Wenning GK. (2009) Multiple systém atrophy: an update. *Lancet Neurol*. 8: 1172-1178

Stejskal D, Vavroušková J, Mareš J, Urbánek K. (2005) Application of new laboratory marker assays in neurological diagnosis - a pilot study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*.149: 265-7

Sunderland T, Linker G, Mirza N, Putnam KT, Friedman DL, Kimmel LH, Bergeson J et al. (2003) Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA*. Apr 23-30; 289 (16): 2094-103.

Süssmuth SD, Uttner I, Landwehrmeyer B, Pinkhardt EH, Brettschneider J, Petzold A et al. (2010) Differential pattern of brain-specific CSF proteins tau and amyloid-beta in Parkinsonian syndromes. *Mov Disord*. Jul 15; 25 (9): 1284-8.

Trojanowski JQ, Revesz T. (2007) Proposed neuropathological criteria for the post mortem diagnosis of multiple systém atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33: 615-20.

van Dijk KD, Teunissen CE, Drukarch B, Jimenez CR, Groenewegen HJ, Berendse HW, van de Berg WD. (2010) Diagnostic cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson's disease: a pathogenetically based approach. *Neurobiol Dis*. Sep; 39 (3): 229-41.

Visser PJ, Verhey F, Knol DL, Scheltens P, Wahlund LO, Freund-Levi Y et al. (2009) Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in

patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* Jul; 8 (7): 619-27.

Yacoubian TA, Standaert DG. (2009) Targets for Neuroprotection in Parkinson's Disease *Biochim Biophys Acta.* 1792 (7): 676–687.

Yao C, Williams AJ, Ottens AK, May Lu XC, Chen R et al. (2008) Detection of protein biomarkers using high-throughput immunoblotting following focal ischemic or penetrating ballistic-like brain injuries in rats. *Brain Inj.* Sep; 22 (10): 723-32.

Yasuda T, Mochizuki H. (2010) The regulatory role of α -synuclein and parkin in neuronal cell apoptosis; possible implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Apoptosis.* Nov; 15 (11): 1312-21.

Wadia PM, Lang AE. The many faces of corticobasal degeneration. (2007) *Park Rel Dis.* 13 Suppl 3:S336-40.

Wang YC, Lee CM, Lee LC, Tung LC, Hsieh-Li HM, Lee-Chen GJ et al. (2011) Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Contribute to the Pathogenesis of Spinocerebellar Ataxia Type 12 (SCA12). *J Biol Chem.* Jun 17; 286 (24): 21742-54.

Weintraub D, Comella CL, Horn S. (2008) Parkinson's disease--Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *Am J Manag Care.* 14 (2 Suppl): S40-8.

Wenning GK, Colosimo C, Geser F, Poewe W. (2004) Multiple system atrophy. *Lancet Neurol.* 3: 93-103

Wenning GK, Stefanova N. (2009) Recent developments in multiple system atrophy. *J Neurol.* Nov; 256 (11): 1791-808

Whitton PS. (2007) Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol.* April; 150 (8): 963–976.

Williams DR, de Silva R, Paviour DC, Pittman A, Watt HC, Kilford L. et al. (2005) Characteristics of two distinct clinical phenotypes in pathologically proven progressive supranuclear palsy: Richardson's syndrome and PSP-parkinsonism. *Brain.* Jun; 128 (Pt 6): 1247-58.

Williams DR. (2006) Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau. *Intern Med J.* Oct; 36 (10): 652-60.

Williams DR, Holton JL, Strand K, Revesz T, Lees AJ. (2007) Pure akinesia with gait freezing: a third clinical phenotype of progressive supranuclear palsy. *Mov Disord.* Nov 15; 22 (15): 2235-41.

Williams DR, Lees AJ, Wherrett JR, Steele JC. (2008) J. Clifford Richardson and 50 years of progressive supranuclear palsy. *Neurology.* Feb 12;70(7):566-73.

Wills J, Jones J, Haggerty T, Duka V, Joyce JN, Sidhu A. (2010) Elevated tauopathy and alpha-synuclein pathology in postmortem Parkinson's disease brains with and without dementia. *Exp Neurol.* Sep; 225 (1): 210-8

Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. (2007) Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Curr Pharm Des.* 13 (18): 1925-8.

Zhang J, Sokal I, Peskind ER, Quinn JF, Jankovic J, Kenney C, Chung KA, Millard SP, Nutt JG, Montine TJ. (2008) CSF Multianalyte Profile Distinguishes Alzheimer and Parkinson Diseases *Am J Clin Pathol.* April; 129 (4): 526–529.

7 Publikace

7.1 Práce související s dizertační prací

7.1.1 Původní vědecké publikace uveřejněné in extenso v recenzovaných vědeckých časopisech s IF

Mareš J., Herzig R., Urbánek K., **Vranová H.**, Houštlík P., Stejskal D., Vavroušková J., Buřval S., Zapletalová J., Kaňovský P. Využití stanovení cystatinu C u pacientů s neurodegenerativními chorobami *Cesk Slov Neurol N*; 2006,102/3,195-199 **IF₂₀₀₆ 0,037**

Vranová H., Kaňovský P., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D., Nestršil I., Zapletalová J. Laboratorní ukazatele neurodegenerace v likvoru a míra motorického postižení u Parkinsonovy nemoci: korelační studie. *Cesk Slov Neurol N*; 2008, vol.71/104, no.3, s.324-328. **IF₂₀₀₈ 0,319**

Mareš J., Kaňovský P., Herzig R., Stejskal D., Vavroušková J., Hlušík P., **Vranová H.**, Buřval S., Zapletalová J., Pidman V., Obereignerů R., Suchý A., Veselý J., Podivínský K., Urbánek K. The assessment of beta amyloid, tau protein and cystatin C in the cerebrospinal fluid: laboratory markers of neurodegenerative diseases. *Neurological Sciences*, 2009, 30: 1-7. **IF₂₀₀₉ 1,006**

Mareš J., Kaňovský P., Herzig R., Stejskal D., Vavroušková J., Hlušík P., **Vranová H.**, Buřval S., Zapletalová J., Pidman V., Obereignerů R., Suchý A., Veselý J., Podivínský J., Urbánek K. New laboratory markers in diagnosis of Alzheimer dementia and other neurodegenerative diseases. *Neurol Research*, 2009, vol. 31, no. 10, s. 1056-1059. **IF₂₀₀₉ 1,630**

Přikrylová Vranová H., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D., Zapletalová J., Hlušík P., Kaňovský P. CSF markers of neurodegeneration in Parkinson's disease. *J Neural Transm* (2010) 117: 1177–1181 **IF₂₀₁₀ 2,597**

Přikrylová Vranová H, Mareš J, Hlušík P, Nevrlý M, Stejskal D, Zapletalová J, Obereigneru R, Kaňovský P. Tau protein and beta-amyloid₁₋₄₂ CSF levels in different phenotypes of Parkinson's disease. J Neural Transm **IF₂₀₁₀ 2,597 – přijato do tisku**

DOI: 10.1007/s00702-011-0708-4

7.1.2 Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných časopisech

Mareš J., Herzig R., Stejskal D., Vavroušková J., Hlušík P., Urbánek K., **Vranová H.**, Zapletalová J., Pidrman V., Kaňovský P. Use of new markers in the diagnostics of neurodegenerative diseases. Scripta Medica (Brno) 2006; 79 (1): 59–67.

7.1.3 Publikovaná abstrakta

Vranová H, Nevrlý M, Mareš J, Herzig R, Kaňovský P. Biological and clinical markers in the central nervous system degeneration 37th international Danube symposium for neurological sciences and continuing education, Book of abstracts. 2005;37(21):147,148

Vranová H, Mareš J, Nevrlý M, Herzig R, Kaňovský P. Biologická a klinické markery poškození nervové soustavy u neurodegenerativních onemocnění: pilotní studie. Nerulógia pre prax [Abstrakt]; 2006: 7 (1)25

Vranová H, Nevrlý M, Mareš J, Herzig R, Kaňovský P. Biological and clinical markers in the central nervous systém degeneration Journal of Neurology [Abstract] Suppl 2, 2006,253,II/77

Vranová H, Mareš J, Nevrlý M, Stejskla D, Herzig R, Kaňovský P. The presence of biological markers of neurodegeneration in the cerebrospinal fluid of patients suffering from neurodegenerative diseases. European Journal of Neurology [Abstract] ; 2006,13,Suppl.2,213

Vranová H., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D., Herzig R., Kaňovský P. CSF biological markers in the central nervous system degeneration Movement Disorders [Abstract]; 2006, Vol.21, Suppl.15, 440

Vranová H., Kaňovský P., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D. The evaluation of tau protein in patient suffering from Parkinson disease. [abstract] Mov Dis 2007, Vol. 22, Suppl.16, 576

Vranová H., Kaňovský P., Nestrašil I., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D. Is the Braak's staging really useful? A correlation analysis of neurodegeneration markers in cerebrospinal fluid and motor impairment in Parkinson disease. [abstract] Park Relat Disord 2007; 13 (Suppl 2) 121-2

Vranová H., Mareš J., Nevrlý M., Herzig R., Kaňovský P. The evaluation of tau-protein in the CSF in patients suffering from Parkinson's disease Journal of Neurology. [abstract] Suppl.3, 2007, 492, III/124

Vranová H., Nevrlý M., Mareš J., Stejskal D., Nestrašil I., Kaňovský P. The role of clusterin in Parkinson disease. [abstract]. Eur J Neur 2008; 15 (Suppl 3) 124

Vranová H., Nevrlý M., Mareš J., Nestrašil I., Stejskal D., Kaňovský P. The role of clusterin in Parkinson disease. [abstract]. Mov Disord 2008; 23 (Suppl 1) 208

Vranová H., Kaňovský P., Nestrašil I., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D. Braak's staging in the clinical practice: Neurodegenerative markers in cerebrospinal fluid and motor impairment in Parkinson disease.[abstract] Neurology 70 2008; 11 (Suppl 1) 325

Vranová H., Kaňovský P., Nestrašil I., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D. Braak's staging in the clinical practice: Neurodegenerative markers in cerebrospinal fluid and motor impairment in Parkinson disease. Journal of Neurology. [abstract] Suppl. 2; 2008, P793

Vranová H., Kaňovský P., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D. Cerebrospinal fluid markers of neurodegeneration in Parkinson's disease." [abstract]. Movement Disorders, 2009, Vol. 24, (Suppl.1) 285-6

Vranová H., Kaňovský P., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D. Neurodegenerative markers in cerebrospinal fluid in Parkinson disease.[abstract]. Neurology 72 March 17, 2009, No. 11 (Suppl 3) A66

Přikrylová Vranová H, Nevrlý M, Mareš J, Stejskal D, Kaňovský P. Neurodegenerative markers in CSF in patients suffering from Parkinson's disease. Neurology March 2, 2010; (Suppl 2)

7.1.4 Seznam přednášek/posterů přednesených na veřejných odborných fórech

Vranová H, Nevrlý M, Mareš J, Herzig R, Kaňovský P. Biological and clinical markers in the central nervous system degeneration 37th international Danube symposium for neurological sciences and continuing education, Book of abstracts. 2005;37(21):147,148

Vranová H, Mareš J, Nevrlý M, Herzig R, Kaňovský P. Biologická a klinické markery poškození nervové soustavy u neurodegenerativních onemocnění: pilotní studie. Nerulógia pre prax [Abstrakt]; 2006: 7 (1)25

Vranová H, Nevrlý M, Mareš J, Herzig R, Kaňovský P. Biological and clinical markers in the central nervous system degeneration Journal of Neurology [Abstract] Suppl 2, 2006,253,II/77

Vranová H, Mareš J, Nevrlý M, Stejskal D, Herzig R, Kaňovský P. The presence of biological markers of neurodegeneration in the cerebrospinal fluid of patients suffering from neurodegenerative diseases. European Journal of Neurology [Abstract] ; 2006,13,Suppl.2,213

Vranová H, Mareš J, Nevrlý M, Stejskal D, Herzig R, Kaňovský P. CSF biological markers in the central nervous system degeneration Movement Disorders [Abstract]; 2006,Vol.21,Suppl.15,440

Vranová H., Kaňovský P., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D. The evaluation of tau protein in patient suffering from Parkinson disease. [abstract] *Mov Dis* 2007, Vol. 22, Suppl.16,576

Vranová H., Kaňovský P., Nestrašil I., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D. Is the Braak's staging really useful? A correlation analysis of neurodegeneration markers in cerebrospinal fluid and motor impairment in Parkinson disease. [abstract] *Park Relat Disord* 2007; 13 (Suppl 2) 121-2

Vranová H., Mareš J., Nevrlý M., Herzig R., Kaňovský P. The evaluation of tau-protein in the CSF in patients suffering from Parkinson's disease *Journal of Neurology*. [abstract] Suppl.3, 2007,492, III/124

Vranová H., Nevrlý M., Mareš J., Stejskal D., Herzig R., Kaňovský P. The evaluation of biological markers of neurodegeneration in the cerebrospinal fluid of patients suffering from neurodegenerative diseases. 3rd International Congress on MSA, Innsbruck 2007

Vranová H., Kaňovský P., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D. CSF biological markers in the central nervous system degeneration. 59th Annual meeting of AAN, Boston 2007

Vranová H., Nevrlý M., Mareš J., Stejskal D., Nestrašil I., Kaňovský P. The role of clusterin in Parkinson disease. [abstract]. *Eur J Neur* 2008; 15 (Suppl 3) 124

Vranová H., Nevrlý M., Mareš J., Nestrašil I., Stejskal D., Kaňovský P. The role of clusterin in Parkinson disease. [abstract]. *Mov Disord* 2008; 23 (Suppl 1) 208

Vranová H., Kaňovský P., Nestrašil I., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D. Braak's staging in the clinical practice: Neurodegenerative markers in cerebrospinal fluid and motor impairment in Parkinson disease.[abstract] *Neurology* 70 2008; 11 (Suppl 1) 325

Vranová H., Kaňovský P., Nestrašil I., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D. Braak's staging in the clinical practice: Neurodegenerative markers in cerebrospinal fluid and motor impairment in Parkinson disease. *Journal of Neurology*. [abstract] Suppl. 2; 2008, P793

Vranová H., Nevrlý M., Mareš J., Kaňovský P. Clusterin u Parkinsonovy nemoci“ na 22.českém a slovenském neurologickém sjezdu Olomouc 2008.

Vranová H., Kaňovský P., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D. Cerebrospinal fluid markers of neurodegeneration in Parkinson's disease." [abstract]. Movement Disorders, 2009, Vol. 24, (Suppl.1) 285-6

Vranová H., Kaňovský P., Mareš J., Nevrlý M., Stejskal D. Neurodegenerative markers in cerebrospinal fluid in Parkinson disease.[abstract]. Neurology 72 March 17, 2009, No. 11 (Suppl 3) A66

Příkrylová Vranová H., Nevrlý M., Mareš J., Stejskal D., Kaňovský P. Neurodegenerative markers in CSF in patients suffering from Parkinson's disease. Neurology March 2, 2010; (Suppl 2)

Příkrylová Vranová H., Mareš J., Hlušík P., Nevrlý M., Stejskal D., Zapletalová J., Obereigner R., Kaňovský P. The profile of CSF neurodegenerative markers in different phenotypes of Parkinson's disease, 15th EFNS Congress, Budapest - Hungary 2011

7.2 Ostatní publikace

7.2.1 Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v časopisech s IF

Nevrlý M., Kaňovský P., **Vranová H.**, Nestrasil I., Langová K.
Ovlivnění plazmatické hladiny homocysteinu u pacientů s Parkinsonovou chorobou terapií L-DOPA a entacaponem. Česk Slov Neurol N 2008; 71/104 (1): 55-60 **IF₂₀₀₈ 0,319**

Nevrlý M., Kaňovský P., **Vranová H.**, Langová K., Hlušík P.
Effect of levodopa and entacapone treatment on plasma homocysteine levels in Parkinson's disease patients. Parkinsonism and Related Disorders 15 (2009) 477-8 **IF₂₀₀₉ 2,406**

Nevrlý M., Kaňovský P., **Vranová H.**, Langová K., Houštl P.
Effect of entacapone on plasma homocysteine level in Parkinson's disease patients. Neurological Science. 2010 Oct; 31 (5): 565-9 **IF₂₀₁₀ 1,120**

7.2.2 Publikovaná abstrakta

Mareš J, Herzig R, **Vranová H**, Hlušík P, Urbánek K, Podivínský J, Vavrušková J, Stejskal D, Adamova K, Sklenářová J, Novotný D, Kaňovský P. Biological role of tau protein and B-amyloid in the cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's dementia European Journal of Neurology. [Abstract] 2005; 12 (suppl.2): 191

Nevrlý M, Ressler P, Nestržil I, **Vranová H**, Herzig R, Kaňovský P. Plasma homocysteine levels in Parkinson's disease patients – the effect of levodopa and entacapone treatment. Pilot study. Journal of Neurology [Abstract] Suppl 2, 2006,253, II/93

Nevrlý M, Ressler P, Nestržil I, **Vranová H**, Herzig R, Kaňovský P. Effect of levodopa and entacapone treatment on plasma homocysteine level in Parkinson's disease. Pilot study. European Journal of Neurology [Abstract]; 2006,13, Suppl.2,93

Nevrlý M, **Vranová H**, Ressler P, Nestržil I, Kaňovský P. Effect of levodopa and entacapone treatment on plasma homocysteine level in Parkinson's disease. Pilot study. Movement Disorders [Abstract]; 2006, Vol.21, Suppl.15,545

Nevrlý M, **Vranová H**, Chovancová Z, Nestržil I, Otruba P, Dufek J, Kaňovský P: Plasma homocysteine concentration and peripheral neuropathy in Parkinson's disease patients: A pilot study. [abstract] Park Relat Disord 2007; 13 (Suppl 2) 49

Nevrlý M, **Vranová H**, Chovancová Z, Otruba P, Dufek J, Kaňovský P. Hyperhomocysteinemia as a risk factor inducing peripheral polyneuropathy in young Parkinson's disease patients: a pilot study. [abstract]. Eur J Neur 2008; 15 (Suppl 3) 124

Nevrlý M, **Vranová H**, Chovancová Z, Otruba P, Dufek J, Kaňovský P. Hyperhomocysteinemia as a risk factor inducing axonal degeneration in peripheral nerves in young parkinsonian patients: A pilot study. [abstract]. Mov Disord 2008; 23 (Suppl 1) 299

Nevrlý M, Opavský R, Otruba P, **Vranová H**, Hlušík P, Kaňovský P. Somatosensory cortex activation changes after botulinum toxin type A injections in post-stroke spasticity. [abstract]. Neurology 72 March 17, 2009, Number 11 (Suppl 3) A110

Nevrly M, Opavsky R, Otruba P, **Vranova H**, Hlustik P, Kanovsky P. Post stroke elasticity: Somatosensory cortex activation changes after botulinum toxin type A injections. [abstract]. Movement Disorders, 2009, Vol.24, (Suppl.1) 454