

Neurofilamenta u traumatického poškození mozku – současné znalosti

Fialová L.

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

SOUHRN

Neurofilamenta jsou neurocytoskeletální struktury, soustředěné zejména v axonech neuronů. Změny hladin neurofilament v biologických tekutinách jsou studovány u různých neurologických onemocnění. V tomto přehledném článku jsou uváděny poznatky ze studií věnovaných stanovení jednotlivých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku a v séru u pacientů s poraněním mozku. Hladiny neurofilament se po úrazu mozku signifikantně zvyšují ve srovnání s kontrolními skupinami. Na rozdíl od některých jiných biomarkerů (např. protein S100b), jejichž hladiny dosahují vrcholových hodnot během 1 až 2 dnů po úrazu, neurofilamenta vrcholí po více než jednom týdnu. Výsledky studií u pacientů s těžkým i mírným poraněním mozku naznačují, že vyšetřování neurofilament by mohlo mít i prognostický potenciál.

Na základě povzbudivých výsledků dosavadních studií se zdá, že vyšetření neurofilament v séru, popř. mozkomíšním moku by mohlo představovat vhodný test, který by přispěl k odhadu závažnosti úrazu a prognózy u poranění CNS. Stanovení neurofilament v séru by doplňovalo vyšetření dosavadních biomarkerů neurotraumatu a stejně tak i zobrazovací vyšetřovací metody.

Klíčová slova: neurofilamenta – mozkomíšní mok – sérum – traumatické poškození mozku.

SUMMARY

Fialová L.: Neurofilaments in traumatic brain injury – current knowledge

Neurofilaments are neurocytoskeletal structures, localized primarily in the axons of neurons. Changes in the neurofilament levels in biological fluids are studied in various neurological disorders. In this review, the findings of studies focused on the determination of individual neurofilament chains in biological fluids in patients with brain injury are presented. Neurofilament levels significantly increase after traumatic brain injury compared to the control groups. Unlike some other biomarkers (such as protein S100b), whose levels reach the highest values within 1 – 2 days after injury, neurofilaments peak after more than one week. The results of studies in patients with severe and mild traumatic brain injuries suggest that neurofilaments could also have prognostic potential.

Based on the encouraging results of previous studies, it appears that serum or cerebrospinal fluid neurofilament determination could be a suitable test which can help to estimate the severity and prognosis of traumatic brain injuries. Determination of serum neurofilaments would complete the examination of existing biomarkers of neurotrauma as well as neuroimaging methods.

Keywords: neurofilaments – cerebrospinal fluid – serum – traumatic brain injury.

Úvod

Akutní poškození mozku zahrnuje závažné stavy končící smrtí nebo zanechávající trvalé zdravotní následky. Hlavními příčinami akutního poškození mozku bývá úraz nebo cerebrovaskulární onemocnění.

Poranění mozku jako následek úrazu patří k významným příčinám mortality a morbidit u dospělých i u dětí. V diagnostickém procesu zaujímají významné místo zobrazovací metody, ale k diagnóze mohou přispět i biochemická vyšetření. Při poškození mozku narůstají v mozkomíšním moku i séru hladiny různých proteinů. Jedním z nich je neuron-specifická enoláza, jejíž zvýšené hladiny jsou popisovány nejen u neurotraumatu, ale i u cévních mozkových příhod, nebo protein 14-3-3, prokazatelný u různých neurologických onemocnění spojených s rozpadem neuronů [1, 2]. V současnosti se stanovuje protein S100b, jehož tkáňová specifita není ale omezena pouze na nervovou tkáň [3, 4]. Cenné informace o destrukci nervové tkáně může přinést i vyšetření méně specifických, ale běžně dostupných

analytů jako jsou některé enzymy (aspartátaminotransferáza, laktátdehydrogenáza nebo kreatinkináza a její izoenzym CK-BB) [5-7].

Stále se hledají další biochemické ukazatele poškození mozku traumatem, jejichž využití by mohlo být užitečné v upřesnění diagnózy, závažnosti poranění i posouzení prognózy [8].

Jsou studovány různé proteiny, zejména ty, které jsou specifické pro nervovou tkáň. Ze znalostí patofyziologických dějů spojených s úrazem mozku vyplývá, že vhodnými kandidáty na biomarkery neurotraumatu jsou neurocytoskeletální struktury. Významným patofyziologickým projevem poškození mozku v důsledku úrazu je difúzní axonální poranění (DAP), které ovlivňuje konečný klinický výsledek. DAP se po mechanickém inzultu postupně vyvíjí a prochází několika stádii. Je spojeno s narušením struktury axonů, charakterizovaném zprvu reverzibilními poruchami neurocytoskeletu a později doprovázeném proteolýzou hojně zastoupených cytoskeletálních struktur [9]. Součástí neurocytoskeletu jako jsou řetězce neurofilament,

popř. jejich degradační produkty, se mohou uvolňovat z poškozených axonů a vstupovat do extracelulární tekutiny [10].

Struktura neurofilament vykazuje uspořádání typické pro střední filamta. Na jejich polymerní struktuře se účastní tři základní součásti, kterými jsou lehké (NFL), střední (NFM) a těžké řetězce (NFH) označované jako neurofilamentový triplet [11].

Poruchy neurofilament jsou popisovány u různých neurologických chorob. Zahrnují změny struktury, které jsou podmíněné mutací genů pro neurofilamentové řetězce nebo abnormálními posttranslačními modifikacemi. Často jsou spojené s akumulací neurofilament (např. Charcot-Marie-Tooth choroby, amyotrofická laterální skleróza, Alzheimerova nemoc) [12, 13]. Při poškození axonů nebo jejich degeneraci může docházet k dezintegraci neurofilament. Jednotlivé řetězce se uvolňují z cytoskeletálních struktur a po přestupu do mozkomíšního moku (MMM) a krve mohou být jejich hladiny vyšetřovány [11].

Klinickým přínosem stanovení jednotlivých řetězců neurofilament v mozkomíšním moku i v séru po traumatu mozku se již zabývala řada studií. Nespornou výhodou neurofilament je jejich specifita pro nervovou tkáň na rozdíl od jiných proteinů rovněž analyzovaných u pacientů s traumatickým poškozením mozku.

Lehké řetězce neurofilament u poranění mozku

Dosud publikované studie zaměřené na stanovení NFL u poranění mozku poskytují informace o jejich hladinách v extracelulární tekutině poškozeného mozku, mozkomíšním moku a v séru (Tabulka 1).

Magnoni et al. [14] testovali hladiny NFL společně s proteinem tau a amyloidem β u 16 pacientů s těžkým traumatickým poškozením mozku. Stanovení proteinů bylo prováděno v extracelulární tekutině poškozeného mozku získané prostřednictvím mikrodialýzy. Jde o metodu využívanou v neurotraumatologii, pomocí níž se získávají vzorky extracelulární tekutiny v mozkové tkáni pro vyšetření různých analytů [15]. Dle očekávání byly hladiny NFL vyšší u pacientů, u nichž byl mikrodialyzační katétr uložen blízko oblasti kontuze. Iatrogenní trauma mozkové tkáně při zavádění katétru autoři považují za málo pravděpodobné. V porovnání s proteinem tau vykazovaly hladiny NFL vyšší variabilitu, ale dynamika obou proteinů byla charakterizována poklesem v průběhu několikadenního sledování. Studie naznačila, že NFL a protein tau mohou doplnit informace o stavu bílé mozkové hmoty po traumatu.

V další studii byly hladiny NFL v MMM, ale i v séru analyzovány retrospektivně u větší kohorty pacientů s traumatickým poraněním mozku. Mezi nimi byly zastoupeny osoby s různě závažným traumatem mozku s převahou pacientů s hodnotami GCS (Glasgow Coma Scale) 3 – 8 [16]. Během prvních 15 dnů po neurotraumatu zůstávaly hladiny NFL v séru i v mozkomíšním moku u jednotlivých pacientů v tomto období poměrně stabilní. Sérové hladiny NFL, stejně jako protein S100b

byly nezávislým prediktorem klinického výsledku traumatického poranění mozku hodnoceného pomocí GOS (Glasgow Outcome Score) v 6. – 12. měsíci po úrazu. Nebyl ale prokázán vztah mezi hladinami NFL a rozsahem difúzního axonálního poškození podle výsledků magnetické rezonance nebo poškozením hodnoceným pomocí CT (výpočetní tomografie). Absenci výše uvedeného vztahu autoři zdůvodňují heterogenitou souboru, ale i omezenými možnostmi neuroradiologických metod stanovit přesně rozsah axonálního poškození. Sérové hladiny slabě, ale významně korelovaly s hladinami v MMM.

V další dlouhodobé longitudinální studii byly analyzovány sérové hladiny NFL u 72 pacientů s těžkým poraněním mozku v prvních 12 dnech po úrazu a vzorek krve byl odebrán i po 12 měsících klinického sledování [17]. Na rozdíl od předchozí studie byla pro stanovení hladin NFL v séru použita řádově citlivější imunoanalytická metoda. Od pacientů, u nichž byla provedena ventrikulostomie, byly získány i vzorky MMM. V obou biologických tekutinách byly ve vzorcích odebraných v akutním stavu do 12. dne po úrazu hladiny NFL signifikantně zvýšené a v období sledování narůstaly (do 12. dne po úrazu). Diagnostická účinnost testu poskytovala velice dobré hodnoty – 97% citlivost a 96% specifitu. V průběhu roku po úrazu se sérové hladiny NFL vrátily k normálnímu rozmezí. Stanovení sérových hladin za 24 hodin po přijetí se jeví jako přínosné i z hlediska odhadu prognózy. NFL v séru byly signifikantně vyšší u pacientů, kteří nepřežili, a korelovaly s hodnotami GOS skóre zjišťovanými po jednom roce.

Dostupné jsou i informace o hladinách NFL u osob s lehkým poraněním mozku. Sportovci, kteří se věnují kontaktním sportům, představují skupinu jedinců vystavených opakovaným úderům do hlavy. Jedna z prvních prací se zaměřila na stanovení NFL v MMM společně s proteinem tau, gliálním fibrilárním kyselým proteinem a β amyloidem u malé skupiny 14 amatérských boxerů [18]. V období 7 – 10 dnů po zápase hodnoty NFL v MMM několikanásobně převyšovaly hladiny u kontrolní skupiny a zvýšení odráželo závažnost a počet úderů do hlavy. Zvýšení NFL v MMM bylo nejvýraznější ze všech testovaných biomarkerů. Během tříměsíčního přerušování sportovní aktivity hladiny výrazně poklesly, ale přesto zůstaly signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny.

Pozdější studie sledovala přínos stanovení hladin NFL v mozkomíšním moku boxerů – olympioniků [19]. I v této studii se NFL jeví jako nejcitlivější biomarker axonálního poškození ve srovnání s dalšími mozkovými biomarkery. Hladiny NFL v MMM u boxerů, u nichž nedošlo ke ztrátě vědomí, s normálním neurologickým nálezem a bez strukturálních změn při vyšetření magnetickou rezonancí, byly signifikantně zvýšené v průběhu 1. až 6. dne po posledním zápase. Zvýšení, i když menší, přetrvávalo dalších minimálně 14 dnů v období bez zápasů, což může svědčit o probíhajících neurodegenerativních změnách. Výše hladin NFL v MMM korelovala s odhadnutým rizikem poškození mozku v souvislosti s boxem. Na rozdíl od zvýšených hladin NFL v MMM ovlivnila opakovaná lehká traumata mozku

Table 1: Neurofilament light chains (NFL) in traumatic brain injury (TBI)

Sample	Subjects	Main result	Reference
CSF (cerebrospinal fluid) – lumbar puncture	Subjects <ul style="list-style-type: none"> • amateur boxers (n = 14) CSF sampling <ul style="list-style-type: none"> • 7 – 10 days after a bout • after a 3 months period of rest from boxing • controls (healthy subjects) (n = 10) 	<ul style="list-style-type: none"> • CSF NFL levels were significantly higher in boxers than in controls in both an acute ($p = 0.0001$) and a rest period ($p = 0.001$). • CSF NFL levels were significantly higher after a bout than those after 3 months of rest ($p = 0.008$). • CSF NFL level increase was significantly higher in boxers who received many hits or were groggy than in those who received few hits ($p = 0.002$). 	[18]
CSF – lumbar puncture	Subjects <ul style="list-style-type: none"> • amateur soccer players (n = 23) CSF sampling <ul style="list-style-type: none"> • 7 – 10 days after the headings • controls (healthy age-matched non-athletic subjects) (n = 9) 	<ul style="list-style-type: none"> • CSF NFL levels did not differ between soccer players and controls. • CSF NFL levels did not correlate with the total number of headings. 	[22]
CSF – lumbar puncture	Subjects <ul style="list-style-type: none"> • Olympic boxers (n = 30) CSF sampling <ul style="list-style-type: none"> • 1 – 6 days after a bout • after a rest period for at least 14 days • controls (healthy age-matched) (n = 25) 	<ul style="list-style-type: none"> • CSF NFL levels were significantly higher in Olympic boxers than in controls in both an acute ($p < 0.001$) and a rest period ($p < 0.001$). • CSF NFL levels increased during 1 – 6 days after a bout. • CSF NFL levels positively correlated with „Boxing Exposure“ score. • Boxers with persisting NFL concentration increase after at least a 14 day rest period post bout had a significantly poorer performance on selected neuropsychological tests than other boxers. 	[19, 20]
CSF – lumbar puncture	Subjects <ul style="list-style-type: none"> • professional ice hockey players with prolonged post concussive symptoms for more than 3 months (n = 16) CSF sampling <ul style="list-style-type: none"> • 4 months (median) after the most recent concussion • controls (neurologically healthy subjects) (n = 15) 	<ul style="list-style-type: none"> • CSF NFL levels were higher in ice hockey players than in controls without statistical significance. • CSF NFL levels were increased in the subgroup of players with postconcussion syndrome for more than 1 year than those with shorter period ($p = 0.02$) or controls ($p = 0.02$). • CSF NFL levels correlated with symptom severity in postconcussion syndrome ($p = 0.02$). • There was a significant correlation between CSF NFL levels and lifetime concussion event ($p = 0.04$). 	[21]
CSF – ventricular Serum	Subjects <ul style="list-style-type: none"> • patient with TBI (traumatic brain injury) (n = 182) Blood sampling <ul style="list-style-type: none"> • 1 – 15 days after TBI 	<ul style="list-style-type: none"> • Serum NFL levels correlated with TBI outcome. • A predictive value of serum NFL for diffuse axonal injury was not found. • Serum and CSF NFL levels were related to the day of sampling. 	[16]

Table 1: Continuation

Serum	<p>Subjects</p> <ul style="list-style-type: none"> patients with severe TBI (n = 72) <p>Blood sampling</p> <ul style="list-style-type: none"> on admission each days 1 – 12 after injury at 12 month after injury controls (neurologically healthy subjects (n = 35)) 	<ul style="list-style-type: none"> Serum NFL levels were significantly higher in patients 0 – 12 days after severe TBI in comparison with controls ($p < 0.0001$). Serum NFL levels were normalized after 12 months. Serum NFL levels at 24 hours after injury and over the period of 1 – 12 days were significantly higher in non-survivors than in survivors ($p = 0.013$ and $p < 0.0001$). Serum NFL levels at 24 hours after injury negatively correlated with Glasgow Outcome Score at 12-months after trauma ($r = -0.34$, $p = 0.01$). 	[17]
Serum	<p>Subjects</p> <ul style="list-style-type: none"> amateur boxers (n = 14) <p>Blood sampling</p> <ul style="list-style-type: none"> 7 – 10 days after a bout after 3 months of rest period professional hockey players (n=35) <p>Blood sampling</p> <ul style="list-style-type: none"> at 1, 12, 36, and 144 hours after concussion when the players returned to play healthy nonathletic controls (n = 14) athletic controls (n = 12) 	<ul style="list-style-type: none"> Serum NFL levels were significantly higher in boxers than in controls in both an acute ($p < 0.0001$) and a rest period ($p < 0.0001$). Serum NFL levels were higher in boxers 7 – 10 days after bout as compared to those after 3 months rest ($p = 0.0007$). A serum NFL level increase was significantly higher in boxers who received many hits (>15) or were groggy than in those who received fewer hits ($p = 0.0023$). Serum NFL levels were elevated in concussed hockey players as compared to controls ($p = 0.035$). Serum NFL levels increased during follow-up with the highest values at 144 hours after concussion in ice hockey players with prolonged post-concussion symptoms . 	[24]
Serum	<p>Subjects</p> <ul style="list-style-type: none"> football athletes – starters (n = 11) football athletes – non-starters (n = 9) <p>Blood sampling</p> <ul style="list-style-type: none"> after 9 weeks of no contact (baseline values) eight-time point blood sampling over the competition season 	<ul style="list-style-type: none"> Serum NFL levels were higher in starters than those in non-starters at baseline. A significant serum NFL level increase was observed over the course of the competition season ($p < 0.002$ – $p < 0.008$). 	[25]

výsledky pouze vybraných neuropsychologických testů (např. prodloužení jednoduchého reakčního času při neuropsychologickém vyšetření) [20].

Nárůst hladin NFL v mozkomíšním moku byl zaznamenán i u některých dalších sportů. U profesionálních hokejistů, u nichž po otřesu mozku přetrvávaly post-kontuzní příznaky déle než rok, bylo pozorováno signifikantní zvýšení NFL v MMM ve srovnání s hokejisty s rychlejšími odezníváním symptomů nebo s kontrolní skupinou [21].

Na rozdíl od profesionálních hokejistů nebylo u amatérských fotbalistů 7 až 10 dnů po tréninku, který zahrnoval nácvik hlaviček, pozorováno zvýšení NFL v mozkomíšním moku v porovnání s kontrolní skupinou. Výše hladin NFL v MMM v této studii nebyla přesně kvantifikována vzhledem k tomu, že se pohybovaly pod detekčním limitem použité ELISA metody [22].

Dlouhodobější sledování vývoje hladin NFL u poranění hlavy u sportovců bylo publikováno ve formě kazuisti-

ky jednoho boxera. MMM byl u něho odebrán dva týdny po zápase, v jehož průběhu došlo k bezvědomí. Téměř desetinásobně zvýšené hladiny NFL v MMM při prvním odběru se normalizovaly až ve 36. týdnu [23].

Cenné jsou výsledky nedávných studií, které uvádějí, že vzestup hladin NFL u závodníků v kontaktních sportech je prokazatelný nejen v MMM, ale i v séru [24, 25]. Stanovení sérových hladin NFL pomocí ultrasenzitivní imunoanalytické metody na bázi Simoa (Single Molecule Array) poskytlo podobnou informaci jako stanovení NFL v MMM [24]. U amatérských boxerů byly sérové hladiny NFL signifikantně vyšší v období mezi 7 až 10 dny po zápase ve srovnání s kontrolní skupinou a i po tříměsíčním klidovém období. Diagnostická efektivita stanovení NFL v séru po zápase i po klidovém období dosáhla vysokých hodnot (0,97 a 0,96) pro plochu pod ROC křivkou (Receiver Operating Characteristic curve). V průběhu tříměsíčního přerušení závodní

činnosti sérové hladiny NFL poklesly, ale stále zůstávaly signifikantně zvýšené v porovnání s kontrolní skupinou. Sérové hladiny diferencovaly i boxery podle závažnosti úderů do hlavy při zápase. Rovněž u kohorty profesionálních hokejistů s otřesem mozku byly zvýšené hladiny NFL ve vzorcích sér, které ve sledovaném období (1 až 144 hodin po otřesu) narůstaly zejména u hokejistů s pomalu odeznívajícími postkontuzními symptomy. Zvýšení NFL v séru bylo pozorováno i u dalších skupin sportovců vystavených poraněním hlavy jako jsou fotbalisté. Sérové hladiny NFL byly vyšší u hrajících fotbalistů ve srovnání s nehrajícími sportovci a zvyšovaly se v průběhu sezóny [25].

Těžké řetězce neurofilament u poranění mozku

Vyhodnocení přínosu stanovení NFH u poranění mozku bylo předmětem několika studií, které nám poskytují představu o jejich hladinách v různých biologických tekutinách (Tabulka 2).

U pacientů s těžkým poraněním mozku se v průběhu 24 až 96 hodin po úrazu zvyšovaly různě fosforylované formy NFH (pNFH) v MMM [26]. Hladiny

pNFH narůstaly i v séru, i když dosažení vrcholových hladin nastalo později. V prvních 10 dnech po traumatu bylo difúzní axonální poškození mozku doprovázeno významnějším vzestupem hladin pNFH v séru ve srovnání s ložiskovým poraněním [27]. Výraznější vzestup u obou forem poranění byl pozorován mezi 4. až 10. dnem hospitalizace. Přítomnost expanzní kontuze neovlivňovala významně sérové koncentrace pNFH.

Podobné výsledky jako u dospělých pacientů byly získány i u dětí. U dětských pacientů po těžkém úrazu mozku se lišila dynamika sérových hladin pNFH podle prognózy [28]. U pacientů, kteří na následky úrazu zemřeli, byly sérové hladiny již od 1. dne po poranění vyšší a rychleji stoupaly do 3. dne a poté se již výrazně neměnily až do ukončení sledování, konkrétně do 6. dne. U dětí, které přežily, stoupaly hladiny pNFH v séru až od 2. dne a mírné zvyšování hladin pokračovalo do 6. dne sledování. Z výsledků ROC analýzy vyplynulo, že pro predikci špatné prognózy jsou vhodné výsledky hladin pNFH v séru vyšetřené 2. až 6. den po úrazu. Hladiny pNFH v séru byly signifikantně vyšší u skupiny dětí s hodnotou GOS = 1 (úmrtí) a u pacientů, u nichž vstupní CT zobrazilo difúzní axonální poškození [29].

Table 2: Neurofilament medium chains (NFM) and neurofilament heavy chains (NFH) in traumatic brain injury (TBI)

Sample	Subjects	Main result	Reference
Neurofilament medium chains			
Serum	Subjects <ul style="list-style-type: none"> patients with severe TBI (traumatic brain injury) (n = 12, samples n = 106) patients with mild TBI (n = 68, samples (n = 68) controls (healthy volunteers) (n = 47) 	<ul style="list-style-type: none"> The median of initial serum NFM levels in patients with severe TBI was significantly higher than those in controls (p < 0.001). The median of serum NFM levels in patients with mild TBI was significantly higher than those in controls (p < 0.001). 	[33]
Neurofilament heavy chains			
CSF (cerebrospinal fluid) – ventricular Serum	Subjects <ul style="list-style-type: none"> severe TBI (n = 9) controls (normal pressure hydrocephalus) (n = 8) 	<ul style="list-style-type: none"> CSF levels of three NFH phosphoforms increased after traumatic brain injury. Serum levels of three NFH phosphoforms significantly increased after TBI. Serum NFH levels were elevated by 24 h post-injury until 96 h post-injury follow-up (p < 0.05). 	[26]
CSF – lumbar puncture	Subjects <ul style="list-style-type: none"> amateur boxers (n = 30) CSF sampling <ul style="list-style-type: none"> 1 – 6 days after a bout after a rest period for at least 14 days. controls (healthy age-matched) (n = 25) 	<ul style="list-style-type: none"> CSF pNFH levels were significantly higher in amateur boxers than in controls in both an acute (p < 0.001) and a rest period (p = 0.02). CSF pNFH levels positively correlated with CSF NFL levels. CSF NFL levels did not correlate with „Boxing Exposure“ score. 	[32]
Serum	Subjects <ul style="list-style-type: none"> children with TBI (< 19 years) (n = 49) <ul style="list-style-type: none"> GOS > 1 (n = 42) GOS = 1 (n = 7) Blood sampling <ul style="list-style-type: none"> after admission and each day 1 – 6 days after admission 	<ul style="list-style-type: none"> Serum pNFH levels were significantly elevated in the 2nd, 3rd and 4th days after brain trauma in the patients with GOS (Glasgow Outcome Score) = 1 than those with GOS > 1 (p = 0.01 – 0.03). Serum pNFH levels were significantly higher in diffuse axonal injury (p < 0.004). 	[29]

Table 2: Continuation

Serum	Subjects <ul style="list-style-type: none"> • children with TBI (< 19 years) (n = 50) Blood sampling <ul style="list-style-type: none"> • after admission and each day 1 – 6 days after admission 	<ul style="list-style-type: none"> • The dynamics of pNFH levels in the children who died after injury and survivors was different. • The levels of serum pNFH from the 2nd to the 6th days after admission seem to be suitable as a predictor of mortality. 	[28]
Serum	Subjects <ul style="list-style-type: none"> • patients with TBI (n = 38) • diffuse axonal injury (n = 10) • focal injury (n = 28) Blood sampling <ul style="list-style-type: none"> • each day for 10 days after admission 	<ul style="list-style-type: none"> • The median of serum NFH was higher in patients with diffuse axonal injury than in those with focal TBI (p < 0.05) during 10 days after admission. • Serum NFH levels increased within the 4th to the 10th days. • Serum NFH levels of patients with expansive contusions did not differ from those without expansive lesions. 	[27]
Serum	Subjects <ul style="list-style-type: none"> • patients with mild TBI (n = 34) Blood sampling <ul style="list-style-type: none"> • on days 1 and 3 after injury • controls (healthy subjects) (n = 28) 	<ul style="list-style-type: none"> • Serum pNFH levels were significantly higher than those in controls by day 1 (p < 0.00001) and day 3 after TBI (p < 0.0001). • Serum pNFH levels in CT+ group were significantly higher than those in CT-group on day 1 after injury (p < 0.008). • Serum pNFH levels negatively correlated with GCS (Glasgow Coma Scale) scores (p < 0.003). 	[31]
Serum	Subjects <ul style="list-style-type: none"> • patients with TBI with GCS score ≤13 on admission (n = 32) <ul style="list-style-type: none"> • moderate TBI (n = 19) • severe TBI (n = 13) Blood sampling <ul style="list-style-type: none"> • at 24 and 72 h after TBI 	<ul style="list-style-type: none"> • Serum pNFH levels were significantly higher in patients with severe TBI than those with moderate TBI at both time points (at 24 h p = 0.022; at 72 h p = 0.007). • The presence of polytrauma or surgical treatment did not influence the serum pNFH levels. • Serum pNFH levels at 24 h after TBI were a good predictive biomarker of fatal outcome at 6 months after TBI (p < 0.001). 	[30]

U těžkých forem poranění mozku dosahují sérové hladiny pNFH vyšších hladin než u lehčího mozkového poranění [30]. Ve srovnání s kontrolami se signifikantní zvýšení sérových hladin pNFH, které negativně korelovaly s výsledky GCS skóre, projevilo i u lehkého traumatického poranění mozku v 1. a 3. dnu po traumatu [31]. Významně vyšší hladiny pNFH v séru byly zaznamenány u pacientů s pozitivním nálezem na CT provedeném 1. den ve srovnání s pacienty s negativními nálezy na CT. Rozdíl v hladinách pNFH v séru mezi skupinami s pozitivním a negativním výsledkem na CT přetrvával i 3. den, ale již nedosáhl statistické významnosti [31]. Přítomnost polytraumatu ani chirurgického ošetření neovlivňovala hladiny pNFH v séru [30]. Analogicky s dětskými pacienty i u dospělých nemocných sérové hladiny pNFH stanovené po úrazu poukázaly na možnost predikce dlouhodobějšího stavu pacientů po mozkovém traumatu [30].

NFH, i když v menší míře než NFL, byly také analyzovány u sportovců vystavených poraněním mozku. U boxerů bylo možné prokázat pomocí zvýšených hladin pNFH takové poškození mozku, které neodhalilo klinické vyšetření ani anamnestické údaje [32]. U sku-

piny 30 amatérských boxerů účastnících se vrcholových soutěží bylo zjištěno signifikantní zvýšení pNFH v MMM odebraném v rozmezí 1. až 6. dne po zápasu. Po 14denním období, ve kterém byla přerušena závodní činnost, hladiny v MMM významně poklesly, ale stále byly signifikantně vyšší v porovnání s kontrolní skupinou. Na rozdíl od NFL výše hladin nekorelovala s počtem úderů do hlavy, které boxeři inkasovali v průběhu týdne před odběrem.

Střední řetězce neurofilament (NFM) u poranění mozku

O průběhu hladin NFM u poranění mozku máme podstatně méně informací než o NFL nebo NFH (Tabulka 2). V nedávné studii byly longitudinálně sledovány sérové hladiny NFM u pacientů s těžkým poraněním mozku [33]. Počáteční hladiny v séru byly signifikantně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou, ale nediferencovaly mezi pacienty s příznivou a nepříznivou prognózou. Signifikantně zvýšené sérové hladiny NFM, i když méně výrazné, doprovázely i lehké poranění mozku. Podrob-

nější analýza ukázala na signifikantně vyšší sérové hladiny u pacientů s polytraumatem, ale negativním CT vyšetřením hlavy než u pacientů s izolovaným poraněním mozku a rovněž negativním CT hlavy. Podle autorů studie mohou k výraznějšímu zvýšení NFM u pacientů s polytraumatem přispívat i NFM uvolněné z periferních nervů poškozených při polytraumatu.

Diskuse a závěr

Neurofilamenta jsou struktury vyznačující se vysokou neuronální specifitou. Představují proto vhodné biomarkery pro poškození nervové tkáně, zejména axonů, v nichž se neurofilamenta soustřeďují [11, 13]. Hladiny jednotlivých řetězců neurofilament jsou již řadu let intenzivně zkoumány u různých neurologických onemocnění vyvolaných odlišnými patofyziologickými mechanismy, ale spojených s poškozením axonů [34-36]. Poškození CNS jako následek úrazu je jedním ze stavů, v nichž by stanovení neurofilament mohlo být přínosné.

Z dosud publikovaných studií vyplynuly informace o hladinách jednotlivých řetězců u těžkých i méně závažných poranění mozku. První studie se soustřeďovaly na vyšetřování NFL v mozkomíšním moku [18, 19]. V poslední době se zájem obrací na stanovení neurofilament v séru, neboť pro odběr krve není zapotřebí invazivní výkon. Po analytické stránce je vyšetřování sérových koncentrací obtížnější vzhledem k tomu, že v krevní cirkulaci se uvolněné řetězce neurofilament naředí. Hladiny neurofilament v séru jsou potom řádově nižší než v MMM a k přesnému stanovení jsou zapotřebí citlivější metody [37]. Vyvinutí vysoce citlivých imunoanalytických metod na bázi chemiluminiscence nebo Simoa umožnilo provedení studií, z nichž máme kvalitní informace i o změnách hladin v séru [24]. Tyto imunoanalytické metody poskytují přesné výsledky i pro nižší koncentrace, což přispívá ke zvýšení diagnostické účinnosti testu. Vzhledem k opakovaně zjišťovaným pozitivním korelacím mezi hladinami NFL v MMM a séru lze předpokládat, že výsledky klinických studií prováděných v různých biologických tekutinách budou obdobné [16, 24].

Hladiny neurofilament se po poranění mozku signifikantně zvyšují ve srovnání s kontrolními skupinami. Přetrvávání zvýšených hladin neurofilament delší dobu po úraze výrazně odlišuje neurofilamenta od jiných biomarkerů (např. protein S100b), jejichž hladiny dosahují maximálních hodnot během 1 až 2 dnů po úraze [4]. Neurofilamenta vrcholí po více než jednom týdnu a jsou zvýšená v MMM i v séru minimálně 10 až 12 dnů [17]. Z toho vyplývá, že i hladiny NFL měřené v delším odstupu od úrazu, mohou odrážet rozsah počátečního děje vedoucího k poškození mozku na rozdíl od biomarkerů s kratším poločasem [16]. Na zvýšených hladinách nelze však vyloučit ani podíl neurodegenerativních změn probíhajících po úraze.

Výsledky studií u pacientů s těžkým i mírným poraněním mozku naznačují, že vyšetřování neurofilament by mohlo mít i prognostický potenciál [17, 21, 28]. Sta-

novení neurofilament v séru by mohlo přispět ke zhodnocení závažnosti poranění mozku.

Výsledky studií u sportovců s vysokým rizikem poranění mozku ukazují, že i u osob s fyziologickým nálezem může opakovaná expozice drobnějším zraněním vyvolat změny v mozkové tkáni, dosud obtížně prokazatelné jinými metodami. Některé z mozkových biomarkerů, včetně neurofilament, by mohly být vhodné k monitorování minimálního poškození mozku, včetně odhadnutí délky období, po které by měl sportovec přerušit účast na zápasech a kdy by se stav mozkové tkáně normalizoval [19, 23]. Neurofilamenta by se mohla uplatnit i v péči o osoby, u nichž je zvýšené riziko opakovaných úrazů mozku.

Na základě dosavadních slibných výsledků a jejich potvrzením rozsáhlejšími prospektivními studiemi by vyšetření neurofilament v séru, popř. mozkomíšním moku, mohlo představovat nenáročný test využitelný k upřesnění diagnostiky a odhadu závažnosti úrazu a prognózy u neurotraumatu. Stanovení neurofilament v séru by doplňovalo vyšetření dosavadních biomarkerů a stejně tak i zobrazovací vyšetřovací metody.

Literatura

1. **Ondrkalová, M., Kalnovičová, T., Štofko, J., Traubner, P., Turčáni, P.** Hladiny neuron-špecifické enolázy při ložiskové ischemii mozku. *Klin. Biochem. Metabol.*, 2006, 14(35), p. 202-206.
2. **Matěj, R., Nováková, J., Koukolík, F., Rusina, R.** Vyšetřování proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku – klinicko-patologická korelace. *Cesk. Slov. Neurol. N.*, 2008, 71/104, p. 695-699.
3. **Matek, J., Vajtr, D., Krška, Z., et al.** Protein S-100b v diferenciální diagnostice komoče mozkové a povrchního poranění hlavy u pacientů v ebrietě. *Rozhl. Chir.*, 2012, 91, p. 545-549.
4. **Thelin, E. P., Nelson, D. W., Bellander, B. M.** A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien)*, 2017, 159, p. 209-225.
5. **Pecháň, I.** Perspektivy enzymologie cerebrospinálního likvoru. *Cesk. Slov. Neurol. N.*, 1989, 52, p. 11-21.
6. **Kelbich, P., Koudelková, M., Machová, H., et al.** Význam urgentního vyšetření mozkomíšního moku pro včasnou diagnostiku neuroinfekcí. *Klin. mikrobiol. inf. lék.*, 2007, 13, p. 9-20.
7. **Somer, H., Kaste, M., Troupp, H., Kontinen, A.** Brain creatine kinase in blood after acute brain injury. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1975, 38, p. 572-576.
8. **Papa, L., Ramia, M. M., Edwards, D., Johnson, B. D., Slobounov, S. M.** Systematic review of clinical studies examining biomarkers of brain injury in athletes after sports-related concussion. *J Neurotrauma*, 2015, 32, p. 661-673.
9. **Němeček, S., Němečková, J., Cerman, J.** Patomorfologické poranění mozku. *Neurol praxi*, 2003, 6, p. 290-295.
10. **Petzold, A., Tisdall, M. M., Girbes, A. R., et al.** In vivo monitoring of neuronal loss in traumatic brain injury: a microdialysis study. *Brain*, 2011, 134, p. 464-483.
11. **Petzold, A.** Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol. Sci.*, 2005, 233, p. 183-198.

12. **Liu, Q., Xie, F., Alvarado-Diaz, A., et al.** Neurofilamentopathy in neurodegenerative diseases. *Open Neurol. J.*, 2011, 5, p. 58-62.
13. **Perrot, R., Eyer, J.** Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders. *Brain Res. Bull.*, 2009, 80, p. 282-295.
14. **Magnoni, S., Esparza, T. J., Conte, V., et al.** Tau elevations in the brain extracellular space correlate with reduced amyloid-beta levels and predict adverse clinical outcomes after severe traumatic brain injury. *Brain*, 2012, 135, p. 1268-1280.
15. **Hejčl, A., Kelbich, P., Bolcha M., et al.** Význam a možnosti vyšetřování metabolismu mozku pomocí mikrodialýzy v neurointenzivní péči. *Klin. Biochem. Metabol.*, 2013, 21(42), p. 13-20.
16. **Al Nimer, F., Thelin, E., Nystrom, H., et al.** Comparative Assessment of the Prognostic Value of Biomarkers in Traumatic Brain Injury Reveals an Independent Role for Serum Levels of Neurofilament Light. *PLoS One*, 2015, 10, p. e0132177.
17. **Shahim, P., Gren, M., Liman, V., et al.** Serum neurofilament light protein predicts clinical outcome in traumatic brain injury. *Sci Rep*, 2016, 6, p. 36791.
18. **Zetterberg, H., Hietala, M. A., Jonsson, M., et al.** Neurochemical aftermath of amateur boxing. *Arch. Neurol.*, 2006, 63, p. 1277-1280.
19. **Neselius, S., Brisby, H., Theodorsson, A., et al.** CSF-biomarkers in Olympic boxing: diagnosis and effects of repetitive head trauma. *PLoS One*, 2012, 7, p. e33606.
20. **Neselius, S., Brisby, H., Marcusson, J., et al.** Neurological assessment and its relationship to CSF biomarkers in amateur boxers. *PLoS One*, 2014, 9, p. e99870.
21. **Shahim, P., Tegner, Y., Gustafsson, B., et al.** Neurochemical Aftermath of Repetitive Mild Traumatic Brain Injury. *JAMA Neurol.*, 2016, 73, p. 1308-1315.
22. **Zetterberg, H., Jonsson, M., Rasulzada, A., et al.** No neurochemical evidence for brain injury caused by heading in soccer. *Br J Sports Med.*, 2007, 41, p. 574-577.
23. **Neselius, S., Brisby, H., Granholm, F., Zetterberg, H., Blennow, K.** Monitoring concussion in a knocked-out boxer by CSF biomarker analysis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, 2015, 23, p. 2536-2539.
24. **Shahim, P., Zetterberg, H., Tegner, Y., Blennow, K.** Serum neurofilament light as a biomarker for mild traumatic brain injury in contact sports. *Neurology*, 2017, 88, p. 1788-1794.
25. **Oliver, J. M., Jones, M. T., Kirk, K. M., et al.** Serum Neurofilament Light in American Football Athletes over the Course of a Season. *J Neurotrauma*, 2016, 33, p. 1784-1789.
26. **Siman, R., Toraskar, N., Dang, A., et al.** A panel of neuron-enriched proteins as markers for traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma*, 2009, 26, p. 1867-1877.
27. **Vajtr, D., Benada, O., Linzer, P., et al.** Immunohistochemistry and serum values of S-100B, glial fibrillary acidic protein, and hyperphosphorylated neurofilaments in brain injuries. *Soud. Lek.*, 2012, 57, p. 7-12.
28. **Žurek, J., Baštáková, L., Mihalčín, M., Forbelská, M., Fedora, M.** Dynamika neurofilamenta pNF-H jako prediktor mortality u dětí s poraněním mozku. *Anest. Intenziv. Med.*, 2010, 21, p. 1214-2158.
29. **Zurek, J., Bartlova, L., Fedora, M.** Hyperphosphorylated neurofilament NF-H as a predictor of mortality after brain injury in children. *Brain Inj.*, 2011, 25, p. 221-226.
30. **Shibahashi, K., Doi, T., Tanaka, S., et al.** The Serum Phosphorylated Neurofilament Heavy Subunit as a Predictive Marker for Outcome in Adult Patients after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*, 2016, 33, p. 1826-1833.
31. **Gatson, J. W., Barillas, J., Hynan, L. S., et al.** Detection of neurofilament-H in serum as a diagnostic tool to predict injury severity in patients who have suffered mild traumatic brain injury. *J Neurosurg.*, 2014, 121, p. 1232-1238.
32. **Neselius, S., Zetterberg, H., Blennow, K., Marcusson, J., Brisby, H.** Increased CSF levels of phosphorylated neurofilament heavy protein following bout in amateur boxers. *PLoS One*, 2013, 8, p. e81249.
33. **Martinez-Morillo, E., Childs, C., Garcia, B. P., et al.** Neurofilament medium polypeptide (NFM) protein concentration is increased in CSF and serum samples from patients with brain injury. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2015, 53, p. 1575-1584.
34. **Norgren, N., Rosengren, L., Stigbrand, T.** Elevated neurofilament levels in neurological diseases. *Brain Res.*, 2003, 987, p. 25-31.
35. **Fialova, L., Bartos, A., Svarcova, J., Zimova, D., Kotoucova, J.** Serum and cerebrospinal fluid heavy neurofilaments and antibodies against them in early multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.*, 2013, 259, p. 81-87.
36. **Fialova, L., Bartos, A., Svarcova, J., et al.** Serum and cerebrospinal fluid light neurofilaments and antibodies against them in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.*, 2013, 262, p. 113-120.
37. **Kuhle, J., Barro, C., Andreasson, U., et al.** Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2016, 54, p. 1655-1661.

Střet zájmů: Autoři prohlašují, že nejsou ve střetu zájmů.

Práce byla podpořena projekty PROGRES Q25 a MZ ČR – RVO VFN 64165, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze.

Do redakce došlo 23. 10. 2017

*Adresa pro korespondenci:
MUDr. Lenka Fialová, CSc.*

*Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky,
1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova
a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze,
Kateřinská 32, 12108 Praha 2
E-mail: lfial@lf1.cuni.cz*