

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Prionové onemocnění člověka – CREUTZFELDTOVA-
JAKOBOVA NEMOC**

Vedoucí diplomové práce: **PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.**

Konzultant: **Ing. Magdalena Smětáková**

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016

VERONIKA SEDLÁKOVÁ

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce Ing. Magdaleně Směťákové za odborné vedení, připomínky, cenné rady a především za trpělivost a čas věnovaný diplomové práci v průběhu jejího zpracování.

Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Oddělení patologie a molekulární medicíny a kolektivu Národní referenční laboratoři lidských TSE/CJN v Thomayerově nemocnici v Praze za ochotu a věnovaný čas a za poskytnutí dostatečného vybavení pro zpracování experimentální části diplomové práce.

Stejně díky patří i mé vedoucí diplomové práce PharmDr. Janě Rathouské, Ph.D. za poskytnuté rady a informace.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 20. 8. 2016

.....
Bc. Veronika Sedláková

1 OBSAH

2	ABSTRAKT.....	6
3	ABSTRACT.....	7
4	ÚVOD	9
5	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	11
6	TEORETICKÁ ČÁST	12
6.1	Prion.....	12
6.1.1	Prionový protein PrP a jeho molekulární struktura.....	12
6.1.2	Infekční prionový protein PrP ^{Sc} a jeho molekulární struktura.....	14
6.1.3	Patogeneze prionového proteinu.....	15
6.1.4	Prionové kmeny.....	17
6.1.5	Prionové onemocnění.....	18
6.2	Creutzfeldtova-Jakobova choroba	21
6.2.1	Historie	21
6.2.2	Výskyt.....	23
6.2.3	Rizikové faktory	25
6.2.4	Formy onemocnění CJN.....	26
6.2.5	Diagnostika onemocnění	29
6.2.6	Léčba.....	37
7	PRAKTICKÁ ČÁST	38
7.1	Metody pro vyšetření likvoru a mozkové tkáně	39
7.1.1	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE).....	39
7.1.2	Western blot (WB)	40
7.1.3	ELISA	43
7.2	Vyšetření přítomnosti β – podjednotky 14-3-3 proteinu.....	47
7.3	Vyšetření přítomnosti prionového proteinu.....	50
7.4	Stanovení koncentrace β -amyloidu.....	54
7.5	Stanovení koncentrace proteinu h-TAU	56
7.6	Stanovení koncentrace proteinu p-TAU	57
8	VÝSLEDKY.....	59
8.1	Vyšetření přítomnosti β – podjednotky 14-3-3 proteinu.....	59
8.2	Vyšetření přítomnosti prionového proteinu.....	62
8.3	Stanovení koncentrace β -amyloidu.....	66

8.4	Stanovení koncentrace h-TAU	69
8.5	Stanovení koncentrace p-TAU	72
9	DISKUZE	75
10	ZÁVĚR.....	79
11	POUŽITÉ ZKRATKY.....	80
12	SEZNAM TABULEK	82
13	SEZNAM OBRÁZKŮ	83
14	SEZNAM GRAFŮ	84
15	POUŽITÁ LITERATURA.....	85

2 ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Bc. Veronika Sedláková

Vedoucí: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Konzultant: Ing. Magdalena Smětáková

Název práce: Prionové onemocnění člověka – CREUTZFELDTOVA-JAKOBOVA NEMOC

Cíl práce: Teoretická část práce podává ucelenou teorii nejen o prionech, ale i o Creutzfeldtově-Jakobově nemoci obecně. Cílem experimentální práce bylo zhodnotit a kvantifikovat mozkomíšní mok a mozkovou tkáň u osmi jedinců s podezřením na prionové onemocnění Creutzfeldtovou-Jakobovou nemocí.

Metody: Pro stanovení přítomnosti 14-3-3 proteinu v mozkomíšním moku a prionového proteinu v nativní mozkové tkáni byla použita metoda Western blot. Výsledky byly vyjádřeny pouze kvalitativně. Pro lepší specifitu byla diferenciální diagnostika doplněna o imunologické vyšetření likvorového tripletu (p-TAU, h-TAU, β -amyloid). Toto kvantitativní stanovení bylo provedeno metodou enzymové imunoanalýzy (ELISA).

Výsledky: U všech osmi podezřelých jedinců bylo potvrzeno onemocnění Creutzfeldtovou-Jakobovou chorobou. Velkým přínosem pro definitivní potvrzení této nemoci bylo stanovení prionového proteinu *post mortem*. Průkaz přítomnosti β -podjednotky 14-3-3 proteinu není specifický, protože je pozitivní u všech rychlých rozpadů mozkové tkáně. Při vyšetření likvorového tripletu byla u β -amyloidu naměřena koncentrace v normě až lehce snížená, kdežto pro celkové h-TAU byly naměřeny výrazně zvýšené koncentrace. Tento nález je typický pro Creutzfeldtovu-Jakobovu nemoc. U fosforylované formy TAU (p-TAU) proteinu byly koncentrace v mozkomíšním moku naměřeny ve fyziologickém rozmezí až lehce zvýšené.

Závěr: Námi naměřené hodnoty u osmi vzorků určených pro diferenciální diagnostiku Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci odpovídají hodnotám uvedeným v současné literatuře a metody tedy lze s výhodou využít v rámci zpřesnění diagnostiky této choroby.

Klíčová slova: prionový protein, prionové onemocnění, Creutzfeldtova-Jakobova nemoc, 14-3-3 protein, h-TAU, p-TAU, β -amyloid

3 ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Bc. Veronika Sedláková

Leader: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Consultant: Ing. Magdalena Smětáková

Title of diploma thesis: Human prion disease – CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE

Objective: Theoretical part of the thesis includes a comprehensive theory not only about prions, but also about Creutzfeldt-Jakob disease in general. The aim of the experimental part was to evaluate and quantify the cerebrospinal fluid and brain tissue of eight individuals suspected from prion disease, Creutzfeldt-Jakob disease specifically.

Methods: To determine the presence of 14-3-3 protein in cerebrospinal fluid and prion protein in the native brain tissue an analytical method called Western blotting was used. Results were expressed only qualitatively. For better differential diagnosis, immunological examination of so-called CSF triplet (p-TAU, h-TAU, β -amyloid) was completed. The quantitative determination was performed by enzyme immunoassay (ELISA).

Results: All eight subjects suspected from the prion disease were confirmed with the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Determination of the prion protein *post mortem* has a great benefit for final confirmation of the disease. Detection of presence of 14-3-3 β -subunit is not specific as it is positive for all fast decays of brain tissue. During the examination of CSF triplet the β -amyloid concentrations were estimated from normal to slightly reduced values whereas the total h-TAU protein concentrations were significantly increased. These findings are typical for Creutzfeldt-Jakob disease. Measuring the concentrations of the phosphorylated

form of TAU (p-TAU) protein gave values within the physiological range or slightly elevated.

Conclusion: Our results of eight samples determined for differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease correspond to the values stated in the current literature and therefore the methods can be advantageously used for more precise diagnosis of this disease.

Keywords: prion protein, prion disease, Creutzfeldt-Jakob disease, 14-3-3 protein, h-TAU, p-TAU, β -amyloid

4 ÚVOD

První zmínka o prionovém onemocnění scrapie sahá až do roku 1738, kdy bylo objeveno u ovcí a koz. Do podvědomí veřejnosti se prionové onemocnění dostalo v souvislosti s bovinní spongiformní encefalopatií v roce 1986 ve Velké Británii. Epidemie zasáhla skot, jenž se nakazil krmivem kontaminovaným prionovým proteinem. O deset let později byla u člověka diagnostikována nová varianta (vCJN), která je způsobena alimentární nákazou z masa postiženého skotu (FRANKOVÁ & KRAUSOVÁ, 2008).

Za původce všech prionových onemocnění se považují prionové částice. Tyto infekční patogeny způsobují skupinu smrtelných neurodegenerativních onemocnění. Podstatou prionového onemocnění je ukládání patologicky změněného prionového proteinu PrP^{Sc} ve formě amyloidových plaků v mozkové tkáni s postupným zánikem neuronů (PRUSINER, 1998). První informace o prionech podal S. B. Prusiner, který po několika letech výzkumu získal Nobelovu cenu (1997) za formulaci prionové hypotézy.

Za nejčastější a také úplně první popsané lidské prionové onemocnění se považuje Creutzfeldtova-Jakobova nemoc. Rozlišujeme tři formy CJN: sporadickou, iatrogenní a familiární. Mezi další familiární onemocnění řadíme fatální familiární insomnií a Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom.

Diagnostika CJN je založena na typickém klinickém obrazu: rychle progredující demence, myoklonus, ataxie, pyramidové, extrapyramidové a prodromálními příznaky. Je doplněna dalšími vyšetřeními: MRI, EEG, stanovením přítomnosti 14-3-3 proteinu a koncentrace tripletu (hlavně proteinu h-TAU) v likvoru. Definitivní potvrzení přítomnosti patogenního prionu v mozkové tkáni je založeno na neurohistologickém vyšetření s klasickými změnami spongiformní dystrofie, numerické atrofie neuronů a izomorfní astrogliózy, doplněné o laboratorní diagnostiku metodou Western blot a molekulárně genetickou analýzou pro určení polymorfismu kodonu 129 *PRNP* genu (RUSINA & MATĚJ, 2014; FRANKOVÁ & KRAUSOVÁ, 2008)

Diferenciální diagnostiku provádí Národní referenční laboratoř lidských prionových chorob v Thomayerově nemocnici Praze, která byla založena v roce 2001. Při podezření na prionové onemocnění je v ČR povinná autoptická verifikace, která podléhá hygienicko-epidemiologickému sledování. Národní

referenční laboratoř byla v roce 2003 začleněna do mezinárodní sítě laboratoří. Hlavní konziliární laboratoř sídlí ve skotském Edinburghu. Na základě transplantačního zákona České republiky začala od roku 2007 jako první laboratoř na světě povinně testovat mozkovou tkáň všech dárců rohovek a navázala spolupráci se všemi očními bankami v ČR (KOUKOLÍK, 2007; RUSINA & MATĚJ, 2014).

5 ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Diplomová práce v teoretické části pojednává o charakteristice prionů, popisuje lidská i zvířecí prionová onemocnění. Nejrozsáhlejší rešeršní částí je popis výskytu, forem, ale především diagnostika Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci.

Cílem experimentální části práce bylo vyšetřit mozkomíšní mok a mozkovou tkáň u zemřelých pacientů s podezřením na neurodegenerativní onemocnění, zaměřené především na Creutzfeldtovu-Jakobovu nemoc. Jednalo se o stanovení jednotlivých markerů této nemoci. Diagnostika CJN je založena na vyšetření přítomnosti prionového proteinu v mozkové tkáni *post mortem* metodou Western blot pomocí dvou primárních protilátek (12F10 a 6H4) a sekundární protilátky IgG-HRP. Stejnou metodou je kvalitativně analyzován protein 14-3-3 v mozkomíšním moku odebraný *ante mortem* pomocí primární protilátky 14-3-3 β (K19) a sekundární protilátky IgG-HRP. Pro diagnostiku Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci je vyšetření doplněno o stanovení likvorového tripletu (p-TAU, h-TAU, β -amyloid) prováděné metodou ELISA. Stanovení bylo prováděno se vzorky osmi zemřelých pacientů, odebraných jak *ante mortem* (mozkomíšní mok), tak *post mortem* (mozkomíšní mok a mozková tkáň). Vzorky mozkomíšního moku odebrané *post mortem* byly vyšetřeny jen v rámci této diplomové práce.

6 TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Prion

Termínem prion se rozumí malá proteinová infekční částice („*proteinaceous infectious particle*“). Název prionový protein (PrP) zavedl Stanley B. Prusiner v roce 1982 (KOUKOLÍK, 2007). Priony se liší od ostatních infekčních částic v různých ohledech - neobsahují nukleovou kyselinu, obsahují jedinou známou modifikovanou formu buněčného prionového proteinu, jenž je zakódován v hostitelském genomu (*PRNP*), a k patogenezi prionového onemocnění přispívají změnou konformace normální formy PrP na formu infekční (SMĚTÁKOVÁ, 2015).

6.1.1 Prionový protein PrP a jeho molekulární struktura

Buněčný PrP, který je tvořen glykoproteinem, je exprimován na povrchu téměř všech buněk v organismu. Jeho hlavní vlastností je vysoká citlivost na působení proteinázy. Molekuly PrP byly nalezeny na vnějším povrchu plazmatických membrán, tzv. lipidových raftech, zejména na nervových buňkách. Na membráně jsou ukotveny prostřednictvím glykofosfatidylinositolu (GPI), jenž může fungovat jako membránový receptor. Dále se mohou nacházet i v jiných tkáních a buňkách, např. T- a B-lymfocytech a slizničních buňkách gastrointestinálního traktu (WHO, 2003).

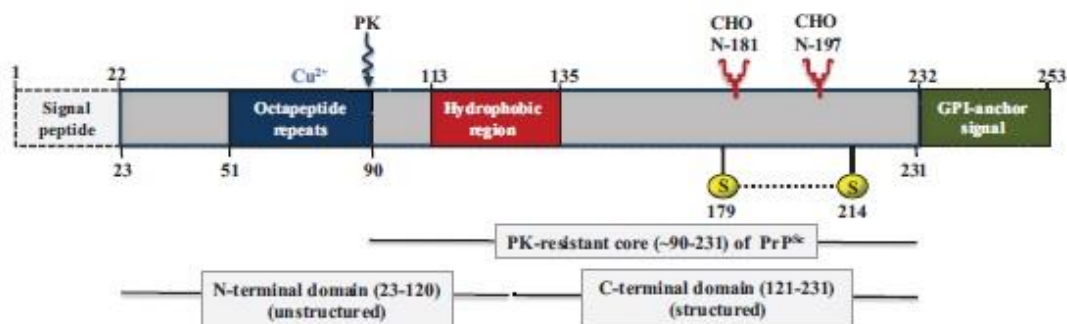
Gen *PRNP* prionového proteinu kóduje 253 aminokyselin a je umístěn na krátkém raménku chromozomu 20. Strukturálně je PrP protein složený ze signálního peptidu (1 – 22 AMK), nestruturované N-koncové domény (23 – 120 AMK) obsahující tandemové repetice oktapeptidu bohatého na prolin/glycin se zvýšenou afinitou k Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} nebo Mn^{2+} . Centrální část prionového proteinu je tvořena hydrofobní oblastí. Následuje strukturovaná C-terminální doména (121 – 231 AMK), která je uspořádána do tří α -helixů (144 – 154, 175 – 193, 200 – 219 AMK) a proložena dvěma malými antiparalelními úseky β -skládaného listu (128 – 131, 161 – 164 AMK). V této doméně je navázán disulfidový můstek mezi AMK Cys₁₇₉ a Cys₂₁₄, který strukturu PrP stabilizuje. Dále tato doména obsahuje dvě N-glykosylační místa na pozici Asp₁₈₁ a Asp₁₉₇ (ACEVEDO-MORANTES & HOLGER, 2014; HANUSOVÁ & KOL., 2015; SMĚTÁKOVÁ, 2015).

Primární struktura celulórního fyziologického prionového proteinu (PrP^C) je neměnná, ke změně dochází až v sekundární struktuře. Převažuje zde konformace α -helixu (45 %) a β -skládaného listu (3 %) složeného ze dvou krátkých řetězců. Molekulová hmotnost tohoto proteinu činí přibližně 33 – 35 kDa (AGUZZI & CALLELA, 2009; WHO, 2003).

Před post-translační modifikací je k C-konci v pozici (232 – 245 AMK) navázána GPI kotva. Ukotvením PrP na vnější stranu membrány nebo v endomembránovém systému následně dochází k odštěpení 23 AMK C-terminální domény a 22 AMK N-terminální domény proteinu (ACEVEDO-MORANTES & HOLGER, 2014; HANUSOVÁ & KOL., 2015).

Fyziologická funkce prionového proteinu nebyla zatím zcela objasněna. Experimentální data přisuzují jeho úlohu v řadě dějů podle lokalizace buňky (HOŘÍN, 2002). Ve velkém množství je obsažen na neuronových spojkách a účastní se synaptických přenosů. Také se mu přisuzuje role v procesech proliferace a diferenciaci neurálních buněk. Podílí se na obnově hematopoetických kmenových buněk a metabolismu mědi. Dále je mu připisována řada imunologických funkcí. Účastní se vývoje T-lymfocytů a inhibice fagocytózy v makrofázích, aktivuje a interaguje s dendritickými buňkami. (SMĚTÁKOVÁ, 2015; KOUKOLÍK, 2007; HANUSOVÁ & KOL., 2015). Nedávné studie objasnily, že PrP^C působí jako specifický receptor pro oligomery β -amyloidu, který zároveň neváže monomery ani fibrily. Zřejmě se může podílet na synaptické toxicitě zprostředkované oligomery β -amyloidu, jež přispívají k rozvoji a progresi Alzheimerovy choroby (HANUSOVÁ & KOL., 2015).

Obrázek 1: Schématická struktura PrP^C



Fyziologický PrP je složený z 253 AMK zbytků, obsahující signální peptid (1 – 22), oktadopeptidovou repetici (51 – 90), hydrofobní část (113 – 115), jednu disulfidovou vazbu mezi cysteinovými zbytky (179 a 214), dvě vazebná N-glykosylační místa na AMK zbytcích (181 a 197) a GPI kotva připojená k C-terminální doméně (232 – 254).

Převzato z (ACEVEDO-MORANTES & HOLGER, 2014).

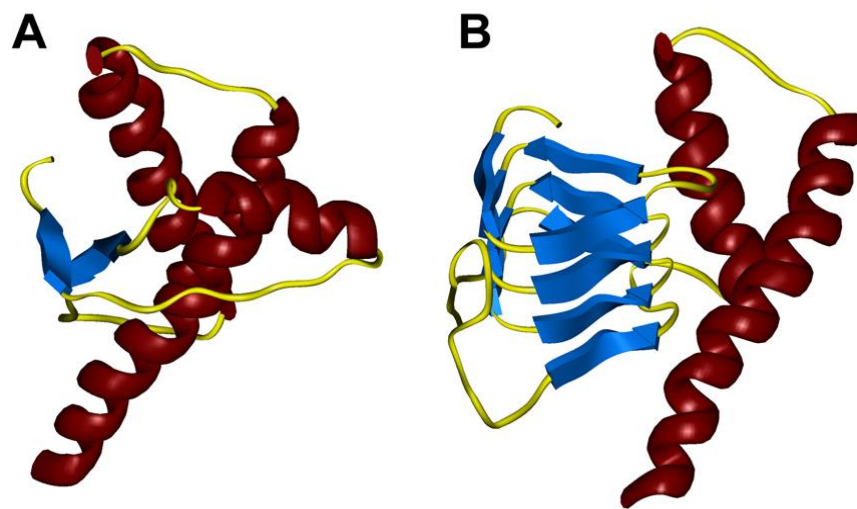
6.1.2 Infekční prionový protein PrP^{Sc} a jeho molekulární struktura

PrP^{Sc} značí patogenní izoformu, která vzniká z fyziologického PrP^C konformační změnou. U této izoformy převládá struktura β -skládaného listu (45 %), podíl α -helixu je snížen (na 30 %) (WHO, 2003). Konaformační změna pro oblast β -skládaného listu nastala v N-koncové doméně, zatímco v C-terminální oblasti zůstaly α_2 -helix a α_3 -helix nezměněny (ACEVEDO-MORANTES & HOLGER, 2014). I přesto, že je struktura PrP^{Sc} jiná, molekulová hmotnost zůstala nezměněna. Jedná se o nerozpustnou izoformu scrapie (onemocnění ovcí), která je rezistentní k působení proteináz (také označována PrP^{Res}), především proteináze K. Působením proteinázy K dochází k hydrolyze N-terminální domény a vzniká tak redukovaná forma PrP^{Sc} o délce 142 AMK (velikosti cca 27 – 30 kDa). U PrP^C dojde působením enzymu proteinázy K k degradaci molekuly. Rezistence k působení enzymu proteinázy K se využívá jako „zlatý standard“ v imunologické diagnostice (KOUKOLÍK, 2007; AGUZZI & CALLELA, 2009; WHO, 2003; SMĚTÁKOVÁ, 2015).

V této odolné formě s vysokým obsahem β -skládaného listu se PrP^{Sc} v buňce hromadí za vzniku proteinových agregátů. Polymerací těchto agregátů

vznikají fibrily amyloidu, které se ukládají do mozkové tkáně ve formě plaků a způsobují degeneraci nervové tkáně (STORCHOVÁ, 1998; PRUSINER, 1998). Hlavní vlastností PrP^{Sc} je právě infekčnost. Stačí vnést do buňky jediný patogenní protein a ten způsobí rozvoj nemoci (viz kap. 6.1.3). Jelikož se PrP^{Sc} liší od PrP^C pouze tvarem molekuly, není imunitní systém schopen odlišit priony jako cizí. Navíc slouží jako prvotní místo pomnožení prionů (STORCHOVÁ, 1998; HANUSOVÁ & KOL., 2015).

Obrázek 2: Molekulární struktura PrP^C a PrP^{Sc}



A - PrP^C s 45 % α -helixu a 3 % β -skládáního listu

B - PrP^{Sc} s 30 % α -helixu a 45 % β -skládáního listu

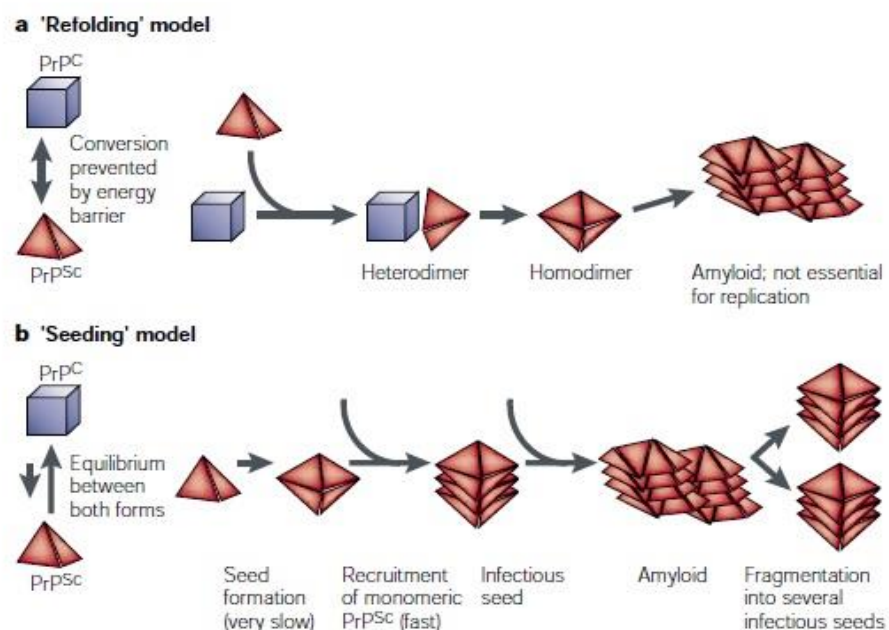
Převzato z https://ucsf.edu/sites/default/files/legacy_files/072902a.jpg [2016-02-26].

6.1.3 Patogeneze prionového proteinu

Základním faktorem prionové patogeneze je konformační přeměna z PrP^C do patogenní izoformy PrP^{Sc}. Podle prionové hypotézy existují dva způsoby konverze PrP^C na PrP^{Sc}. První model se nazývá „refolding“ – řízený templátem. Kontakt PrP^C s patologicky změněným PrP^{Sc} vyvolá v PrP^C přeměnu, který se tak také stává patogenní. Tato změněná forma je schopna vyvolat onemocnění a přenést jej na dalšího jedince. Vysoká energetická bariéra brání spontánní přeměně molekul na další PrP^{Sc}. (HOŘÍN, 2002; AGUZZI & CALLELA, 2009;

GLIEROVÁ & HOLADA, 2006). Druhý model nukleace, tzv. seeding, je postaven na existenci reverzibilní termodynamické rovnováhy mezi PrP^C a nepatrným množstvím PrP^{Sc} (GLIEROVÁ & HOLADA, 2006). Molekuly PrP^{Sc} se nahromadí do uspořádaného nerozpustného agregátu a přidávají se další monomery PrP^{Sc} , které následně vytvoří amyloidové plaky. Amyloid se může rozpadnout na několik infekčních ložisek („seeds“) (SMĚTÁKOVÁ, 2015; GLIEROVÁ & HOLADA, 2006).

Obrázek 3: Mechanismus přeměny fyziologického proteinu PrP^C na infekční formu proteinu PrP^{Sc}



- A) „Refolding“ konverze řízená templátem. Spontánní interakcí endogenního PrP^C s exogenním PrP^{Sc} dochází překonání energetické bariéry a přeměně dalších PrP^{Sc} .
- B) „Seeding“ model se nachází v termodynamické rovnováze mezi oběma formami PrP^C a PrP^{Sc} . Změna termodynamické rovnováhy ve prospěch PrP^{Sc} tvoří další ložiska („seeds“) až do vzniku amyloidu, který se může rozpadnout na další infekční ložiska („seeds“).

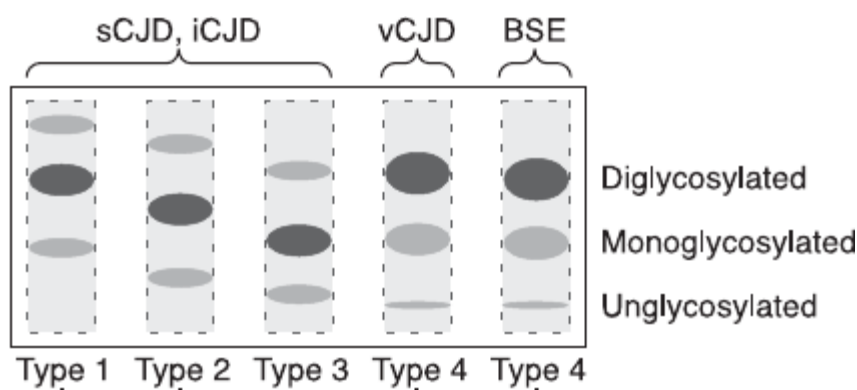
Převzato z (AGUZZI & AL., 2001).

6.1.4 Prionové kmeny

Existence prionových kmenů je jeden z nezáhadnějších jevů, ale i významnou vlastností prionů. Prionové kmeny jsou definovány jako infekční izoláty, které pokud jsou přeneseny do totožného hostitele, mohou navozovat různé formy prionového onemocnění. Liší se fenotypickými vlastnostmi: délkou inkubační doby, profily histopatologických lézí, specifickými neuronálními cílovými oblastmi a znaky proteinových agregátů (AGUZZI & CALLELA, 2009; HOŘÍN, 2002).

Velmi významné rozlišení prionových kmenů je především u CJN, kde byly identifikovány čtyři hlavní typy (HOŘÍN, 2002). Tyto jednotlivé kmeny se rozlišují relativním zastoupením tří forem. PrP^{Sc} může existovat monoglykosylovaný, diglykosylovaný a nebo zůstat v neglykosylované formě. Metodou Western blot je lze rozlišit na základě jednotlivých bandů (SMĚTÁKOVÁ, 2015; KOUKOLÍK, 2007).

Obrázek 4: Zastoupení tří glykosylovaných forem PrP^{Sc} po působení enzymu proteinázy K



Všechny případy sporadické a iatrogenní formy CJN jsou spojeny s typy 1 – 3. Nová varianta CJN je spojena s typem 4, stejně jako bovinní spongiformní encefalopatie (BSE).

Převzato z (AGUZZI & CALLELA, 2009)

6.1.5 Prionové onemocnění

Prionové onemocnění nebo také transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE – transmissible spongiform encephalopathy), zahrnuje skupinu onemocnění způsobených ukládáním patologicky změněného prionového proteinu ve formě amyloidových plaků v mozkové tkáni. Následkem onemocnění dochází k postupnému zániku neuronů. Prionová onemocnění se liší různě dlouhou inkubační dobou a způsobem přenosu prionového proteinu (RUSINA & MATĚJ, 2014; ROHAN & KOL., 2015). Tyto neurodegenerativní choroby postihují nejen lidi, ale také zvířata. Ve všech případech mají fatální následky (KOUKOLÍK, 2007).

6.1.5.1 Lidská prionová onemocnění

Lidská prionová onemocnění nejsou častá. Nejčastěji se v populaci vyskytuje Creutzfeldtova-Jakobova choroba (viz kap. 6.2). Mezi další lidská prionová onemocnění řadíme Kuru, Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom (GSS) a fatální familiární insomni (FFI). Všechna tato onemocnění mají charakteristický klinický obraz rychle progredující demence s mozečkovou a extrapyramidovou symptomatologií. Definitivní potvrzení diagnózy prionových onemocnění je založeno na neuropatologickém vyšetření mozkové tkáně, které je doplněno o vyšetření imunologické (Western blot, imunohistochemie) a molekulárně genetické (RUSINA & MATĚJ, 2014; ROHAN & KOL., 2015).

- **Kuru**

V roce 1950 bylo toto onemocnění popsáno americkým lékařem slovenského původu Danielem Carletonem Gajdusekem. D. C. Gajdusek získal v roce 1979 Nobelovu cenu za zdařený experimentální přenos infekčního agens na šimpanze.

Onemocnění kuru („*laughing death*“), které se vyskytovalo endemicky mezi členy kmene Fore v části Papuy-Nové Guineji, vzniklo v důsledku rituálního kanibalismu. K přenosu infekce došlo při požívání tepelně neupravených mozků zemřelých (KROMBOLZ, 2015; RUSINA & MATĚJ, 2014; KOUKOLÍK, 2007). Ke klinickým projevům docházelo poměrně pozdě. Inkubační doba nemoci byla 4 až více než 35 let. Nemoc postihovala především ženy a děti, nemoc trvala průměrně 3 – 9 měsíců, avšak nejdelší průběh nemoci byly 2 roky. Typickým

klinickým příznakem byl třes, odtud také pochází název „kuru“. Další klinické příznaky byly progredující mozečková ataxie, choreatické pohyby, emoční labilita, dysartrie, nepřilíš hluboká demence. V současnosti je kuru zcela vymýcené díky zamezení rituálního kanibalismu (RUSINA & MATĚJ, 2014; KROMBHOLZ, 2015; WHO, 2003).

- **Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom (GSS)**

Vzácné autosomálně dominantní onemocnění bylo objeveno v roce 1936 (KOUKOLÍK, 2007). Onemocnění je způsobeno několika mutacemi *PRNP* genu na 20. chromozomu, a to nejčastěji P102L (asi 80 % veškerých případů), které bylo zjištěno v rakouské rodině a popsáno Gerstmannem, Sträusslerem a Scheinkerem. (RUSINA & MATĚJ, 2014; KROMBHOLZ, 2015). U GSS se prokazuje také další mutace A133V s rozmanitým klinickým průběhem připomínajícím progresivní supranukleární obrnu (ROHAN & KOL., 2013). Existují i jiné mutace, např. Q217R/129V a F198S/129V (WHO, 2003).

Klinické příznaky se objevují mezi 3. a 4. dekádu s mnohem delším průběhem (až 5 let) než je u CJN. Onemocnění se projevuje se mozečkovou ataxií s pyramidovými příznaky, později kognitivní deteriorací. Pro toto onemocnění je charakteristický neurohistologický obraz přítomnosti tvarově i tinkčně typických amyloidových plaků v bílé hmotě (RUSINA & MATĚJ, 2014; KROMBHOLZ, 2015; ROHAN & KOL., 2013).

První informace o záchytu GSS onemocnění v České republice byly na konci 80. let minulého století. Do současnosti byly autopticky ověřeny 3 případy GSS s patogenní variací P102L v *PRNP* (ROHAN & KOL., 2013).

- **Fatální familiární insomnie (FFI)**

Fatální familiární insomnie je autosomálně-dominantně dědičné onemocnění, které bylo poprvé popsáno v roce 1990. Může však existovat i vzácná sporadická forma tohoto onemocnění (KOUKOLÍK, 2007). Vzácné onemocnění FFI je způsobeno bodovou mutací D178N genu *PRNP* v kombinaci s metioninem na kodonu 129. Projevuje se převážnou nespavostí, autonomní dysfunkcí, častými pyramidovými příznaky, myoklonií a v pokročilém stádiu pak dochází k úplné insomnii, těžké demenci a mutismu (RUSINA & MATĚJ, 2014; KROMBHOLZ, 2015; ROHAN & KOL., 2013). U homozygotů je průběh nemoci

mnohem rychlejší, než vykazují heterozygoti (SMĚTÁKOVÁ, 2015). V České republice dosud nebyla žádná forma FFI prokázána (ROHAN & KOL., 2013).

6.1.5.2 Prionové choroby u zvířat

O prionových chorobách zvířat vznikly záznamy mnohem dříve než u lidí. První zmínka sahá do roku 1738, kdy byla popsána ve Francii scrapie neboli „klusavka“ (KOUKOLÍK, 2007). Klusavka je typické TSE degenerativní onemocnění postihující CNS ovcí a koz. Postižená zvířata mají tendenci si násilně vyškubávat a dřít kožichy o pevné předměty. Přesný mechanismus šíření klusavky zatím zůstává nejasný, ale v úvahu přichází jak infekční přínosy, tak genetické faktory. Přenos infekce zůstává v rámci stejného druhu. S největší pravděpodobností dochází k přenosu při bahnění. Z počátku jsou klinické příznaky nepatrné, kdy dochází ke změně chování doprovázené neurologickými příznaky, ke změně držení těla, pohybu a známkám kožního poškození (WHO, 2003).

O pár let později byly popsány spongiformní encefalopatie norků (TME), kočičí spongiformní encefalopatie (FSE), chronické kachektizující onemocnění jelenů a losů (CWD), ale také u antilop i jiných druhů exotických zvířat v zoo (KOUKOLÍK, 2007).

Bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) neboli „nemoc šílených krav“ byla poprvé zaznamenána ve Velké Británii v roce 1986. Příčinnou vzniku je pravděpodobně mutace v genu *PRNP* či náhodné změny konformace bovinního proteinu bez imunitní odezvy (KOUKOLÍK, 2007). Šíření nákazy bylo pravděpodobně způsobeno použitím krmiv obsahujících masokostní moučku kontaminovanou prionovým proteinem. Problém nastal v recyklaci a změnách nastavení zařízení, kde docházelo ke zpracování uhynulých zvířat a živočišných odpadů. Po dvou letech byl ve Velké Británii vydán zákon o zákazu zkrmování hospodářských zvířat. Výskyt nákazy BSE podléhá povinnému hlášení (AGUZZI & CALLELA, 2009; WHO, 2003). Inkubační doba je různá a může dosahovat délky až 5 let. Neexistuje žádná účinná léčba a důsledky onemocnění jsou fatální (WHO, 2003).

6.2 Creutzfeldtova-Jakobova choroba

Creutzfeldtova-Jakobova nemoc (CJN) je vzácné neurodegenerativní onemocnění. Je nejčastější formou transmisivní spongiformní encefalopatie, která je způsobena akumulací patologického prionového proteinu (PrP^{Sc}) v CNS. Hlavní příčinou CJN je konformační přeměna fyziologického prionového proteinu, který se nachází v mnoha tkáních, na strukturu patologickou (RUSINA & MATĚJ, 2014). PrP^{Sc} má v mozkové tkáni tendenci agregovat do tzv. amyloidových plaků. Postupně dochází k vakuolizaci neuritů, zániku neuronů a zmnožení buněk astrocytů. Všechny tyto znaky se spojují v jeden pojem spongiformní dystrofii, která má za následek houbovitý vzhled mozkové tkáně (ROHAN & KOL., 2015).

Patologické PrP se vyskytují ve formě různých kmenů, které se liší fenotypy prionových chorob, délkou inkubační doby a patologickými příznaky (AGUZZI & CALLELA, 2009). CJN se vyskytuje ve čtyřech formách:

- sporadicky (nejčastější forma)
- familiárně (genovou mutací)
- iatrogeně (náhodným přenosem v souvislosti s lékařským výkonem)
- variantně (nová varianta) (ROHAN & KOL., 2015).

Diagnostika CJN je založena na kombinaci klinického obrazu (rychle progredující demence, myoklonie, zrakové poruchy) a nálezů pomocných vyšetření (likvor, EEG, MRI). Definitivní diagnostika vyžaduje potvrzení neurohistologicky, imunohistochemicky a molekulárně geneticky. Tato vyšetření v České republice zajišťuje Národní referenční laboratoř lidských prionových chorob v Thomayerově nemocnici v Praze (ROHAN & KOL., 2013; RUSINA & MATĚJ, 2012).

6.2.1 Historie

První lidské prionové onemocnění typu CJN bylo popsáno v roce 1920 německými neurology Hansem Gerhardem Creutzfeldtem a Alfonsem Mariem Jakobem (KROMBHOLZ, 2015). Na výročním zasedání v Německu byly zveřejněny informace od A. M. Jakoba, jenž popsal klinicko-patologický syndrom třech pacientů (dvou žen ve věku 51 a 34 let a jednoho muže ve věku 43 let). Tento syndrom se projevoval křečovými stavy a progresivní demencí s kortikální

degenerací páteře. Nezávisle na sobě byl H. G. Creutzfeldtem v tehdejší době popsán případ 22leté ženy s 6letou progresivní mozkovou dysfunkcí. Creutzfeldt sledoval pacientku od jejích 16 let, kdy se nemoc začala projevovat. Z počátku se nemoc projevovala dosti nepravidelně. Docházelo ke změnám v chování a vývojové ataxii. Později se začaly projevovat pyramidové příznaky, třes, myoklonie, nystagmus a demence. Nakonec pacientka zemřela při epileptickém záchvatu.

Oba lékaři si pečlivě zaznamenávali svoje zápisky. Zatímco Creutzfeldt sledoval pouze jeden případ, Jakobovi počet případů vzrostl na sedm. U těchto případů se klinické příznaky zcela lišily. První tři případy nepovažoval za skupinu onemocnění CJN. Diagnostikoval zde syfilis, malárii a chronický alkoholismus i přesto, že se případy podobaly klinickými příznaky CJN. Klinické příznaky u části pacientů, kteří pocházeli z jedné rodiny, se projevovaly jako nervové poruchy se spongiformní změnou v mozkové tkáni. Jakob tyto neuropatologické změny klinicky pojmenoval jako „spastická pseudoskleróza“. Creutzfeldt však měl k tomuto názvu námitky a navrhl všeobecnější pojem „pseudoskleróza“. Pozdější studie ukázaly, že Creutzfeldtův případ 22leté pacientky nebyla CJN, ale Wilsonova choroba. Jakobovy popisky případů odpovídaly klinickým příznakům CJN a tudíž se mu připisuje první popis výskytu CJN. Diagnóza CJN byla potvrzena identifikací mutace v genu *PRNP* (TRIARHOU, 2009). Později byly popsány další případy této formy onemocnění. Pojem „Creutzfeldtova-Jakobova nemoc“ byl zaveden německým lékařem Waltherem Spielmeierem v roce 1922 (WHO, 2003; TRIARHOU, 2009).

Původcem CJN jsou priony, které popsal v roce 1982 Stanley B. Prusiner. Problematikou se začal zabývat v roce 1972, když mu zemřel pacient na CJN. Zjistil, že podobné symptomy odpovídají chorobě popsané u ovcí – scrapii. Pro průkaz infekčního agens si zřídil experimentální laboratoř. Postupně dokázal, že infekční materiál nemá nukleovou kyselinu a nemůže se nadále replikovat. Prusiner a jeho tým pokračovali ve výzkumu. Izolovali gen kódující prionový protein. Díky zdařilému výzkumu mohli prozkoumat charakteristické vlastnosti PrP. Objasnili, že některá prionová onemocnění mohou být dědičná a jiná mohou být následkem bodové mutace. Prusiner na základě této vědecké činnosti získal mnoho cen, ale vrcholem bylo až získání Nobelovy ceny v roce 1997 za tzv. prionovou hypotézu, viz kap. 6.1.3. Svoji úlohu sehrálo také objevení nové

varianty CJN (vCJN). První případy vCJN byly diagnostikovány ve Velké Británii v roce 1996 u konzumentů hovězího masa, které pocházelo z krav postižených transmisivní spongiformní encefalopatií (FERENČÍK, 1998).

6.2.2 Výskyt

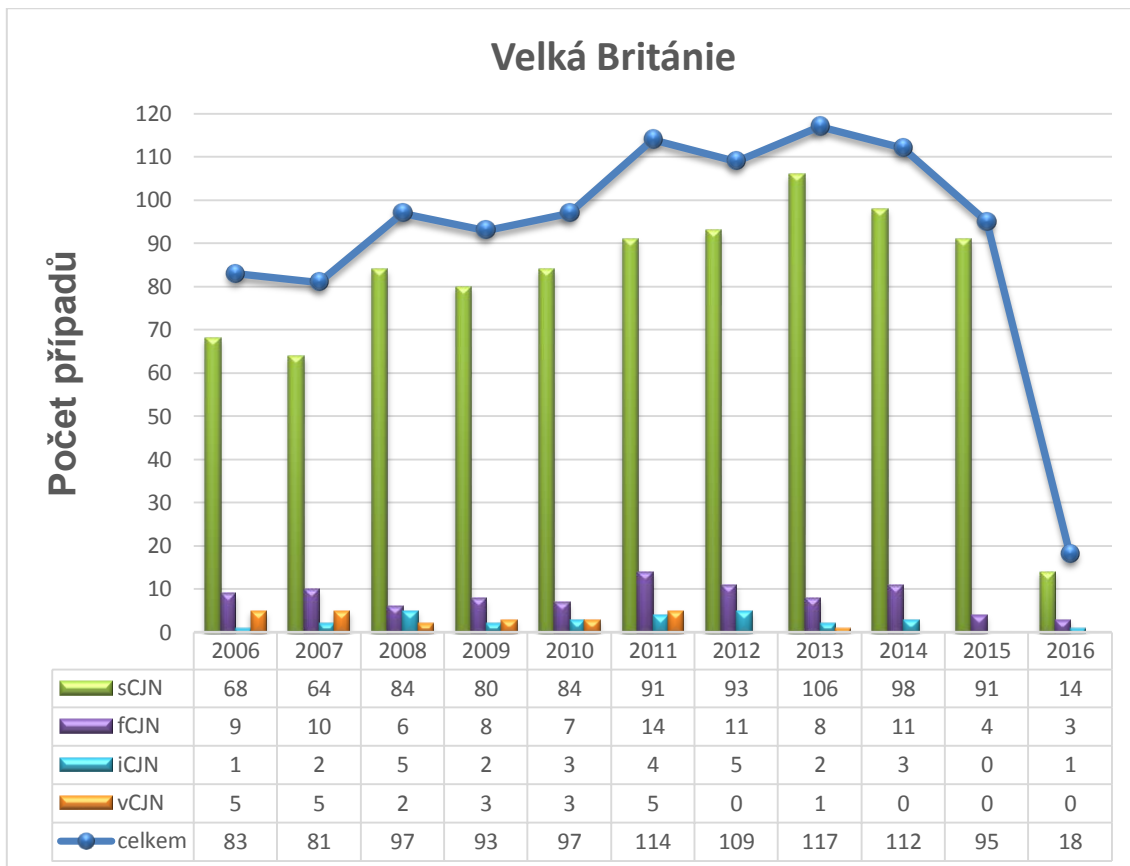
CJN je vzácné neurodegenerativní onemocnění. První zmínka o CJN pochází z roku 1920 z Velké Británie. Výskyt CJN není příliš častý, největší procento zaznamenaných případů neustále pochází z Velké Británie.

U sCJN je zaznamenán celosvětový výskyt v 1 – 2 případech na milion obyvatel ročně. Tato statistika se týká převážně starší populace (kolem 65 let) bez ohledu na pohlaví.

Níže je uveden graf definitivního počtu úmrtí na CJN ve Velké Británii za posledních 10 let. Poslední aktualizace těchto údajů byla provedena k datu 7. 3. 2016. Na tomto grafu je zřejmé, že výskyt onemocnění CJN stoupá. Od roku 2014 však dochází k pozvolnému poklesu zaznamenaných případů úmrtí. V daném grafu jsou uvedeny případy onemocnění jednotlivými formami CJN.

Za posledních 10 let jsou zaznamenány pouze jednotlivá onemocnění různých forem CJN, nejvíce onemocnění tvoří forma sCJN, kdy se jedná maximálně o desítky případů ročně.

Graf 1: Definitivní počet úmrtí ve Velké Británii v období 2006 – 2016 (stav k 7. 3. 2016)



Převzato a upraveno z <http://www.cjd.ed.ac.uk/documents/figs.pdf> [2016-03-07].

V rámci České republiky bylo statisticky zahrnuto období od roku 2006 do části roku 2016. Do současné doby byl v České republice zaznamenán pouze výskyt familiární a sporadické formy onemocnění. Nesmíme však opomenout, že riziko výskytu zbylých dvou variant onemocnění je neustále reálné. Průběžně zaznamenané počty onemocnění CJN v České republice stoupají. Tato vedená statistika v rámci České republiky souhlasí s celosvětovým výskytem onemocnění, tedy 1 – 2 případy na milion obyvatel ročně.

Graf 2: Definitivní počet úmrtí v České republice v období 2006 – 2016 (stav k 17. 3. 2016)



Převzato a upraveno z (ROHAN & KOL., 2015; Interní data Národní referenční laboratoře lidských prionových chorob v Thomayerově nemocnici v Praze).

6.2.3 Rizikové faktory

Na vznik CJN má vliv řada faktorů. Dle rizikových faktorů můžeme CJN předběžně zařadit do jednotlivých forem onemocnění.

- Věk – není příliš rozhodující, ale přesto jsou v jednotlivých formách rozdíly. Sporadické forma CJN se spíše vyskytuje u starší populace bez ohledu na pohlaví. Průměrný věk v období vzniku onemocnění je 65 let. Naopak u nové varianty CJN je průměrný věk úmrtí 29 let. Nemoc této formy postihuje mladší jedince od 20 do 40 let (RUSINA & MATĚJ, 2014).
- Genetické vlivy – mají svoji podstatu u dědičných forem, které jsou způsobeny mutacemi kódující v oblasti genu *PRNP*. Při vzniku CJN hraje významnou úlohu polymorfismus kodonu 129. Ten sám o sobě prionové onemocnění nezpůsobuje, ale může ovlivnit riziko rozvoje či průběh CJN. Polymorfismus genu *PRNP* v oblasti kodonu 129 se vyskytuje ve více alelách a genotyp tohoto genu ovlivňuje vnímavost ke vzniku onemocnění.

Díky záměně nukleotidů v kodonu 129 se může vyskytovat aminokyselina metionin (M) nebo valin (V). Mohou vytvářet genotyp homozygotní (MM či VV), který má největší vnímavost vůči prionovým onemocněním. Naopak minimální vnímavost mají heterozygoti (MV) (HOŘÍN, 2002; RUSINA & MATĚJ, 2014; ROHAN & KOL., 2013; RUSINA & MATĚJ, 2012).

- Náhodný přenos – přenos infekčního agens z osoby na osobu prostřednictvím kontaktu není znám. K tomuto způsobu přenosu dochází ojediněle s různě dlouhou inkubací. Nejčastěji k přenosu dochází při neurochirurgických výkonech či kontaminovaným durálním štěpem. Možnost přenosu krevní transfuzí je spojována jen novou variantou CJN (RUSINA & MATĚJ, 2014).

6.2.4 Formy onemocnění CJN

V současnosti jsou popsány čtyři formy CJN:

- sporadická
- familiární
- iatrogenní
- nová varianta

6.2.4.1 Sporadická CJN (sCJN)

Sporadická forma CJN je vzácné neurodegenerativní onemocnění s nejčastějším výskytem případů (až 85 %). U této formy onemocnění nebyly identifikovány žádné zjevné rizikové faktory. Obvykle se projevuje rychle progredující demencí s různými neurologickými příznaky. Predispozicí pro vznik sCJN je výskyt polymorfismu v oblasti kodonu 129 genu *PRNP*, jenž může být kódován aminokyselinou metioninem nebo valinem (RUSINA & MATĚJ, 2014). Samotný polymorfismus není patologický. Homozygotní varianta MM zvyšuje riziko výskytu sCJN asi o 72 % a u VV o 17 %. U heterozygotní varianty MV je frekvence výskytu sCJN nižší o 17 % než u běžné populace, v tomto případě má spíše protektivní charakter (GDOVINOVÁ, 2013). Tyto polymorfismy se také vyznačují specifickými subtypy s rozdílným klinickým obrazem (ROHAN & KOL., 2015). Rozlišujeme 6 subtypů sCJN. Liší se od sebe rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi PrP^{Res} týkající se typu 1 a typu 2. Také se mohou

vyskytovat současně 2 subtypy. Nejčastější subtyp MM1 se vyskytuje ve 40 % případů a v kombinaci MM1 + MV1 asi v 70 % případů. Subtypy MM1/MV1 jsou sloučeny do jednoho podtypu, protože jsou fenotypově prakticky nerozpoznatelné (GDOVINOVÁ, 2013; PARCHI, 2012). Právě tyto subtypy jsou nejtypičtější svými klinickými příznaky, jako je rychle progredující demence, ataxie, myoklonie a porucha zraku. Asi z 15 % se vyskytuje subtyp VV2, u nějž dominuje ataxie. Myoklonie a demence vzniká později nebo vůbec. Další subtypy jsou v menším procentuálním zastoupení a liší se svými klinickými příznaky minimálně. Pro snadnější a rychlejší diagnostiku můžeme subtypy rozdělit do dvou skupin. První skupina je typická pro kognitivní subtypy MM1, MV1, MM2, VV1 a druhá skupina subtypů VV2, MV2 s převažující ataxií (GDOVINOVÁ, 2013).

Dobře rozpoznatelná, ale vzácná varianta sporadické formy se nazývá Heidenhainova. U této varianty převažují projevy postižení zrakově-prostorových funkcí, včetně vizuálních halucinací a korové slepoty. Další vzácná varianta vypovídá o výrazné cerebelární ataxii s nystagmem. Jedná se o variantu Brownellovu-Oppenheimerovu (RUSINA & MATĚJ, 2014).

Klinický obraz

Na počátku onemocnění je průměrný věk pacienta 65 let. Doba trvání rozvinuté nemoci je průměrně asi 8 měsíců. 90 % pacientů umírá do 1 roku po stanovené diagnóze a necelé 4 % pacientů přežijí 2 roky. Postižení nemocných je stejné bez ohledu na pohlaví (KROMBHOLZ, 2015; RUSINA & MATĚJ, 2012).

Sporadická CJN se nejprve projevuje nespecifickými příznaky a to únavou, bolestí hlavy, nespavostí, depresí a snížením hmotnosti. Následně dochází k rychle se vyvíjející demenci minimálně se dvěma současně přítomnými typickými příznaky, kterými mohou být myoklonie, pyramidové a extrapyramidové projevy (vedou ke změnám svalového tonu s ataxií, poruchami chůze), mozečková ataxie, zrakové dysfunkce (výpadky zorného pole, zrakové halucinace), nystagmus a případně akinetický mutismus (pacient je nepohyblivý, rigidní, není schopen souvislé řeči). Tato kritéria jsou typická pro dané onemocnění a pro vyloučení jiných forem CJN (RUSINA & MATĚJ, 2014; RUSINA & MATĚJ, 2012).

6.2.4.2 Familiární CJN (fCJN)

Genetická forma CJN se vyskytuje asi u 10 – 15 % případů. Jedná se o autozomálně dominantní typ dědičnosti s 50 % rizikem onemocnění v první linii. Familiární CJN klinicky probíhá úplně stejně jako sporadická forma, avšak v různých generacích stejné rodiny se může lišit. Proto je důležité, aby byla při diagnóze splněna kritéria CJN u příbuzného v 1. stupni příbuznosti (KROMBHOLZ, 2015; RUSINA & MATĚJ, 2014). Familiární CJN je způsobena mutacemi genu *PRNP* na 20. chromozomu. V současnosti je popsáno nejméně dvacet různých mutací. Důsledkem je záměna jedné aminokyseliny bodovou mutací či změna počtu oktapeptidových repetitivních sekvencí na N-konci PrP inzercí či delecí (RUSINA & MATĚJ, 2014; RUSINA & MATĚJ, 2012).

Nejčastější zastoupení mutace E200K je u Židů libyjského původu, ale také hojně na Slovensku (v oblasti Oravy). V České republice byl zaznamenán tento typ mutace u 25 případů. Dále byly zachyceny v ČR mutace D178N u 5 případů a velmi vzácná mutace R208H u 1 případu. Další velmi rozšířenou mutací je D178N, která v kombinaci s valinem na 129 kodonu dává vznik fCJN, kdežto v kombinaci s metioninem na 129 kodonu vyvolává FFI. Rozšířená je i v západní Evropě. Pravděpodobnost, že se onemocnění projeví během života, je vysoká a zvyšuje se věkem, např. na Slovensku a v Itálii dosahuje 60 %, u jiných populací je po 85. roce života až 100 % (ROHAN & KOL., 2015; RUSINA & MATĚJ, 2014; ROHAN & KOL., 2013).

6.2.4.3 Iatrogenní CJN (iCJN)

Dnes se používá pojem náhodně přenesená (accidentally transmitted) CJN. K náhodnému přenosu dochází při neurochirurgických výkonech. Ten je nejčastěji způsoben transplantací rohovky, transplantací *dura mater*, užitím růstového hormonu a gonadotropinu získaných z kadaverózních hypofýz, použitím nedostatečně sterilizovaných intracerebrálních elektrod a jiných chirurgických nástrojů. Proto bylo České republice od roku 2007 zavedeno vyšetření mozku všech dárců rohovek. V současnosti bylo ve světě popsáno přes 400 případů s inkubační dobou 1 – 30 let dle způsobu přenosu. Klinické projevy iCJN odpovídají klinickému průběhu sCJN (RUSINA & MATĚJ, 2014; KOUKOLÍK, 2007; KROMBHOLZ, 2015).

Nebyly zjištěny žádné nové zdroje nákazy. V současné praxi se neustále kombinují postupy a zlepšují metody desinfekce pro citlivé chirurgické nástroje (BROWN & AL., 2012). Iatrogenní přenos by měl být omezen na nejnižší míru. Proto je nutností dodržení preventivních opatření při chirurgických zákrocích, označení biologicky nebezpečných vzorků, správné opatření při čištění a dekontaminaci nástrojů (RUSINA & MATĚJ, 2012).

6.2.4.4 Nová varianta CJN (vCJN)

Nová varianta nebo také Willova nemoc byla popsána ve Velké Británii v roce 1996. Největším předpokladem výskytu vCJN u člověka je alimentární přenos při konzumaci hovězího masa z dobytka nakaženého BSE (ROHAN & KOL., 2015). Všechny případy vCJN jsou 100 % homozygoti MM v kodonu 129 genu *PRNP* (RUSINA & MATĚJ, 2014).

Klinický obraz

Klinické příznaky vCJN se poměrně liší od sCJN. Nemoc většinou postihuje mladší jedince mezi 20 a 40 lety. Úmrtí nastává průměrně ve věku 29 let (RUSINA & MATĚJ, 2014). Inkubační doba bývá dosti variabilní. Doba trvání nemoci je přibližně 14 měsíců. Klinický průběh onemocnění bývá o něco pomalejší, než je tomu u sCJN (KROMBHOLZ, 2015).

vCJN se projevuje časnými psychiatrickými projevy: depresí, úzkostí, agresivitou (prudké výbuchy zlosti, záchvaty křiku, rozbíjení věcí), emoční labilitou a také příznaky podobajícími se schizofrenii. Symptomatologií neurologických projevů jsou mozečková ataxie, poruchy čítí (s bolestivými parestéziemi a dysestéziemi na končetinách) a zhoršené vidění s diplopií. Později se postupně rozvíjí demence a může se vyskytovat i myoklonie (RUSINA & MATĚJ, 2014; ROHAN & KOL., 2015; RUSINA & MATĚJ, 2012).

6.2.5 Diagnostika onemocnění

Prvotní diagnostika závisí především na klinických příznacích a průběhu onemocnění, kterými můžeme poukazovat na konkrétní formy CJN. Jsou nezbytná pro potvrzení klinické diagnózy. Do těchto pomocných vyšetření řadíme EEG, MRI a vyšetření likvoru (RUSINA & MATĚJ, 2012; EDINBURGH, 2016). Definitivní diagnostika jakékoliv formy prionového onemocnění vyžaduje

neurohistologické vyšetření, které je doplněné imunohistochemickými metodami, imunologickými metodami (Western blot) a molekulárně-genetickými. Pro uzavření definitivní diagnózy jsou možné pouze kombinace těchto přístupů (RUSINA & MATĚJ, 2014; ROHAN & KOL., 2015).

Metody laboratorního vyšetření CJN jsou stanoveny mezinárodně dohodnutými diagnostickými kritérii. Je důležité provádět vyšetření tak, aby pomáhala včasné a přesné diagnóze jednotlivých forem CJN (EDINBURGH, 2016).

Tabulka 1: Diagnostická kritéria WHO pro vCJN

Hlavní kritéria		
I	A	Progresivní neuropsychiatrické onemocnění
	B	Trvání nemoci > 6 měsíců
	C	Výsledky rutinního vyšetřování nenabízejí alternativní diagnózu
	D	Nepřítomnost potenciální iatrogenní expozice v anamnéze
	E	Nejedná se o fCJN
II	A	Psychiatrické příznaky (deprese, úzkosti, apatie, halucinace)
	B	Perzistující bolestivé senzorické projevy
	C	Ataxie
	D	Splněno alespoň 1 kritérium (myoklonus, chorea, dystonie)
	E	Výsledky rutinního vyšetřování nenabízejí alternativní diagnózu
III	A	EEG: generalizované trifázické komplexy s periodicitou 1 s, nebo není provedeno EEG
	B	MRI symetrického hypersignálu v talamickém pulvinaru
IV	A	Pozitivní biopsie tonsil

Převzato a upraveno z (RUSINA & MATĚJ, 2014).

Číselná kritéria z tabulky 1 jsou dále využita v navazující tabulce 2 diagnostických kritérii dle WHO.

Tabulka 2: Diagnostická kritéria WHO pro sCJN a vCJN

	sCJN	vCJN
Možná CJN (Klinický obraz)	Progresivní demence	kritéria I
	Trvání nemoci < 2 roky	Splněny alespoň 4 z 5 kritérii II
	Negativní EEG	
	Myoklonus Zrakové nebo mozečkové projevy Pyramidové a extrapyramidové postižení Akinetický mutismus	III A (negativní EEG)
Pravděpodobná CJN (klinický obraz + pomocná vyšetření)	možná sCJN	Splněna kritéria I
	EGG s typickým nálezem	Splněny alespoň 4 z 5 kritérii II
	přítomnost proteinu 14-3-3	III A + III B (negativní EEG, typický MRI nález) nebo I + IV (biopsie mandle)
	MRI hyperintenzní signály v putamen FLAIR sekvence - korové proužky Difuzní vážení	
Definitivní CJN (neuropatologický průkaz)	Histologický nález (spongiformní dystrofie, numerická atrofie neuronů a glióza)	Kritéria I A
	Imunohistochemický nález	Neuropatologický průkaz spongiformních změn
	Western blot (PrP ^{Sc})	Extenzivní depozita PrP s floridními plakami
	Genetické vyšetření (určení polymorfismu kodonu 129 genu <i>PRPN</i> a familiární formy)	

Převzato a upraveno z (RUSINA & MATĚJ, 2014).

6.2.5.1 Elektroencefalografie (EEG)

EEG je jedinou diagnostickou metodou, která sleduje mozkovou aktivitu přímo. Není pro neurodegenerativní onemocnění příliš specifická, ale u rychle progredujících demencí může podpořit diferenciální diagnostiku. EEG metoda je příznačná pro sporadickou formu CJN, u vCJN nacházíme nespecifický obraz velmi pomalých difuzních vln, což zpochybňuje výsledek. V EEG záznamu pacientů s sCJN nacházíme typický obraz generalizovaných symetrických trifázických či polyfázických periodicky se opakujících vln o délce 100 – 300 ms v intervalech 0,5 – 2 s. Specifita této metody je 86 % s 67 % senzitivitou. Jelikož se změny EEG postupně vyvíjejí, je třeba vyšetření opakovat. EEG metoda se stala součástí diagnostických kritérií pro sCJN (RUSINA & MATĚJ, 2014; RUSINA & MATĚJ, 2012).

6.2.5.2 Magnetická rezonance (MRI)

Teprve od roku 2010 se magnetická rezonance používá k diagnostice CJN a je součástí diagnostických kritérií. Jedná se o moderní zobrazovací metodu, která se používá k přesnému zobrazení jednotlivých řezů mozku. Cílem magnetické rezonance u CJN je zhodnocení rozsahu, symetrie a lokalizace atrofie.

Pro sporadickou formu CJN se nejvíce využívá zobrazení tzv. FLAIR sekvence (sekvence na magnetické rezonanci s potlačením signálu volné vody) s difuzním vážením se 67 % senzitivitou a až 93 % specifitou (RUSINA & MATĚJ, 2012; RUSINA & MATĚJ, 2014). Zobrazení v difuzním vážení (DWI) je postaveno na principu T2-váženého obrazu v horizontální rovině. Na DWI obrazech se zobrazují vysoké signály při ischemických změnách a edémech. Především v oblasti bazálních ganglií, putamen, nukleus caudatus, inzule a korových proužkách na FLAIR sekvenci. FLAIR sekvence se používá pro odlišení zobrazení T2-váženého obrazu v transverzální rovině. Velmi přínosné je doplnění FLAIR sekvence se zobrazením v difuzním vážení. FLAIR sekvence některé patologické změny neodliší a způsobí tak na obrazech artefakty. Dalším zobrazením pro sCJN je T1 vážení. Je nejvhodnější pro zobrazení atrofie v 3D modelu. Zvýšený signál se může vyskytovat v oblasti globus pallidus.

U vCJN je také charakteristický MRI nález, který je prokázán až u 90 % případů. Typickým nálezem jsou symetrické hypersignály v oblasti pulvinaru

a oblastí předního putamenu: pulvinarový příznak – „hokejky“ (RUSINA & MATĚJ, 2012; RUSINA & MATĚJ, 2014; KOUKOLÍK, 2007).

6.2.5.3 Laboratorní diagnostika likvoru

Laboratorní diagnostika proteinu 14-3-3, h-TAU, p-TAU a β -amyloidu z mozkomíšního moku je pro CJN značně senzitivní. Žádné z těchto stanovení však není pro prionová onemocnění 100 % specifické. V mnoha publikacích byl pro CJN potvrzen velký význam stanovení h-TAU proteinu. Využití výše zmíněných proteinů v diagnostice bylo omezeno na pokročilejší stadia onemocnění (LUKAN & AL., 2013; ENGELBORGHS & AL., 2008). Kombinace těchto markerů zvyšuje specifčnost pro CJN v rámci jiných neurodegenerativních onemocnění (ENGELBORGHS & AL., 2008). Všechna tato vyšetření se provádějí v Národní referenční laboratoři lidských prionových chorob v Praze.

- **Protein 14-3-3**

Protein 14-3-3 jako významný mozkový protein byl poprvé popsán Moorem a Pertezem v roce 1967 (RUSINA & MATĚJ, 2014; MATĚJ & KOL., 2008). Vyskytuje se na všech eukaryotických buňkách a účastní se fyziologických pochodů CNS, zejména v neuronálních synapsích (MATĚJ & KOL., 2008; SCHMITZ & AL., 2016). V buňkách se nachází celkem sedm odlišných izoform (alfa, beta, gama, éta, epsilon, zeta, sigma a tau). Isoformy alfa, beta a gama 14-3-3 proteinu jsou považovány za specifické markery pro diagnostiku sCJN z mozkomíšního moku (SCHMITZ & AL., 2016). Doposud není známa přesná funkce těchto proteinů (RUSINA & MATĚJ, 2014). Vzhledem k jejich roli při regulaci signální transdukce, signálních kaskád, buněčného cyklu a apoptózy jsou převládajícím faktorem pro onemocnění jako je neurodegenerace, rakovina a poruchy reprodukce (AGHAZADEH & PAPADOPOULOS, 2016). Stanovení proteinu 14-3-3 má praktický význam u rychle progredujících neurodegenerativních demencí. Tento nespecifický marker je důležitý pro klinické potvrzení sCJN formy a je součástí diagnostických kritérií (RUSINA & MATĚJ, 2014).

Větší význam pozitivního výsledku proteinu 14-3-3 v likvoru se přikládá rychle progredující demenci. U jiných neurodegenerativních

onemocnění dochází k pozvolnému neuronálnímu rozpadu, což způsobuje komplikaci pro detekci tohoto proteinu. Proto není diagnostika u CJN specifická a výsledek nemusí být vždy pozitivní. Analýza 14-3-3 proteinu je součástí diagnostických kritérií, kdy hodnota specifity a senzitivity je kolem 93 %. Průkaz se provádí z mozkomíšního moku metodou Western blot a výsledek je tak vydán kvalitativně. Přítomnost proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku u vCJN bývá negativní (RUSINA & MATĚJ, 2014; RUSINA & MATĚJ, 2012).

- **Celkový tau protein (h-TAU)**

Název TAU je odvozen z anglického názvu „tubulin associated unit“ (RUSINA & MATĚJ, 2014). Patří do skupiny proteinů, které se spojují jen s mikrotubuly (MAP) (KOLAROVA & AL., 2012). Protein h-TAU se fyziologicky vyskytuje v neuronech, kde reguluje růst neuritů. Fosforylací stabilizuje mikrotubulární strukturu v axonech centrálně nervového systému. Velmi významný je pro uspořádání tubulinových monomerů do mikrotubulů a jejich následné seskupení ve tvaru sítě. Udržuje strukturu a umožňuje napojení mikrotubulů na ostatní elementy, které jsou součástí cytoskeletu (VALIŠ, 2008a; JOHNSON & STOO THOFF, 2004). Velmi významně se podílí na regulaci axonálního transportu (JOHNSON & STOO THOFF, 2004).

Protein je složený ze šesti izoform s různou délkou polypeptidového řetězce 352 – 441 AMK. Existují i menší izoformy, které se vyskytují převážně v periferním nervovém systému (FIALOVÁ & KOL., 2011; RUSINA & MATĚJ, 2014; MANDELKOW & MANDELKOW, 2012). Gen pro TAU protein se vyskytuje na 17. chromozomu a je kódován genem *MAPT* (microtubulin associated unit) (RUSINA & MATĚJ, 2014).

Fosforylace TAU proteinu hraje v buňce úlohou nejen fyziologickou, ale také patologickou (JOHNSON & STOO THOFF, 2004). Pokud je TAU protein nadměrně fosforylován 3-glykogensyntázou, agreguje do fibril, čímž ztrácí stabilitu, dochází k porušení transportu v axonech a rozpadu cytoskeletu. Nakonec protein vytvoří neurofibrilární klubka (tangles) složená z párové helikální filamenty a tím dochází k zániku neuronů a demenci (KOUDELKOVÁ, 2009). Díky velkému a rychlému rozpadu

neuronů u CJN dochází k výraznému zvýšení koncentrace TAU proteinu v mozkomíšním moku (FIALOVÁ & KOL., 2011; RUSINA & MATĚJ, 2014). Zvýšená koncentrace také závisí na rychlosti progresu onemocnění (HORT & KOL., 2007).

- **Fosforylovaný protein (p-TAU)**

Běžně užívaný název fosforylovaný (hyperfosforylovaný) TAU protein lze podle všeho označit za zavádějící název. Celkový TAU i p-TAU protein obsahují fosforylaci. Izoforma p-TAU proteinu je fosforylována na specifických pozicích 231 (threonin), 199 (serin) a 181 (threonin), což je hlavní rozdíl od h-TAU proteinu (BARTOŠ & KOL., 2012).

Jeho koncentrace koreluje s množstvím neurofibriliárních klubek. Protein p-TAU má pro odlišení Alzheimerovy choroby od jiných typů demencí o něco vyšší specifitu než h-TAU protein. Pro diagnostiku CJN není až tak významný - má koncentraci v normě až lehce zvýšenou (RUSINA & MATĚJ, 2014).

- **β -amyloid**

Fyziologickou součástí buněčné membrány je prekurzor amyloidového proteinu, který je štěpen α -sekretázou, čímž vzniká solubilní β -peptid o velikosti 39 – 40 AMK (HORT & KOL., 2007; KOUDELKOVÁ, 2009; VALIŠ, 2008a). β -amyloid se vyskytuje ve dvou hlavních izoformách: kratší forma končící řetězec valinem na pozici 40 ($A\beta$ -40) a delší forma končící řetězec alaninem na pozici 42 ($A\beta$ -42). Za normálních okolností převažuje kratší forma $A\beta$ -40, která je solubilní a tělem vylučována (HORT & KOL., 2007). $A\beta$ -40 se aktivně účastní při tvorbě nových neuronálních synapsí (JIRÁK, 2008). Pokud dojde k patologickým podmínkám, je prekurzor amyloidového proteinu štěpen enzymy β -sekretázou a následně γ -sekretázou, čímž vzniká β -amyloid o délce 42 – 43 AMK (KOUDELKOVÁ, 2009; VALIŠ, 2008a; MUCHY & LEVINE, 2010). Tyto fragmenty mezi sebou nejprve oligomerují a agregačním procesem vznikají velmi neurotoxické molekuly. Následně tyto peptidy polymerují a vznikají tak patologické β -amyloidy. Kratší forma $A\beta$ -40 se převážně akumuluje do cév a do mozkové kůry. Delší forma $A\beta$ -

42 tvoří základní jádro v perineuronálních neuritických placích (JIRÁK, 2008; PERL, 2010; MUCHY & LEVINE, 2010). V oblasti výskytu β -amyloidu dojde následkem jeho toxicity ke spuštění dalších procesů, jako jsou zánětlivé působky s aktivací zánětlivých enzymů cyklooxygenáz, uvolnění nadměrného množství excitačních AMK, aktivace proteinkináz a degradace proteinu TAU. Tím vznikají neurofibrilární klubka („tangles“) v axonech i tělech neuronů. Výsledkem je zánik neuronů (HORT & KOL., 2007; KOUDELKOVÁ, 2009; JIRÁK, 2008).

Stanovení samotného A β -42 není pro CJN nikterak významné, protože se vyskytuje v normálních až mírně snížených hodnotách. Je mnohem významnější pro odlišení jiných demencí, především pro Alzheimerovu chorobu, kdy dochází k výraznému snížení hodnot A β -42 (VAN EVERBROECK & AL., 1999).

6.2.5.4 Neuropatologie

Neuropatologie je založena na neurohistologickém vyšetření mozkové tkáně a doplněna dvěma laboratorními metodami: imunohistochemií a Western blotem. Typickou neurohistologickou změnou je u sCJN spongiformní dystrofie, která se vyskytuje v bazálních gangliích a kůře mozečku. Charakterizují ji vakuoly v šedé hmotě mozkové, které pronikají do všech korových vrstev. Vakuoly se objevují v ložiskách a je důležité je odlišit od artefaktů, vakuol a mozkového edému, jenž se vyskytují při frontotemporálních lobárních degeneracích. Jsou doprovázené numerickou atrofií neuronů a zmnožením astroglií. Metodou Western blot je určen subtyp patologicky změněného prionového proteinu. Na imunohistologickém vyšetření je založeno stanovení přítomnosti patologického prionového proteinu. Ke stanovení využívá různých typů protilátek, např. 3F4, 12F10, 6H4. U sCJN je možné provést mozkovou biopsii, u vCJN zase biopsii tonsil. Senzitivita biopsie mozku nepřesahuje 35 %, proto není tato diagnostika příliš častá. Navíc jsou pacienti vystaveni riziku iatrogenního přenosu infekčního agens.

Novou variantu CJN lze od sCJN jednoznačně rozlišit, neboť je charakterizována velkým počtem floridních plaků v mozkové kůře a mozečku. Tyto plaky se vyskytují v pokročilém stádiu spongiformní dystrofie. Dochází ke snížení množství neuronů a astroglióze především v zadních jádrech talamu,

v mozkové kůře a mozečku. Pro imunohistochemickou reakci jsou typická perineuronální a axonální depozita ve striatu a shluky depozit PrP^{Sc}. Tato depozita se také dají prokázat v mezencefalu a šedé hmotě mozkového kmene a prodloužené míchy. Zcela odlišný je od sCJN obraz imunologický. Prionové proteiny můžeme prokázat imunohistochemicky v periferních lymforetikulárních tkáních, do kterých řadíme tonsilu, apendix, slezinu a lymfatické uzliny. Biopsie tonsil se používá jako podpůrná diagnostika při podezření na vCJN. Provedení biopsie se provádí chirurgicky a je třeba dbát na bezpečnostní opatření pro možný výskyt infekce. Biopsie se nedoporučuje pacientům s pozitivním EEG, negativním nálezem MRI nebo u atypických případů (RUSINA & MATĚJ, 2014; KOUKOLÍK, 2007; RUSINA & MATĚJ, 2012; ROHAN & KOL., 2013; GDOVINOVÁ, 2013; EDINBURGH, 2016).

6.2.6 Léčba

Klinický průběh Creutzfeldtovy-Jakobovy choroby je terapeuticky zcela neovlivnitelný a vždy končí fatálně. V současnosti neexistují pro léčbu žádné terapeutické postupy, proto se u většiny pacientů provádí léčba symptomatická. Tato terapie je zaměřená na potlačení doprovodných potíží onemocnění, nikoli na příčiny. Léky, které se používají pro symptomatickou léčbu, dokáží pozastavit a stabilizovat průběh onemocnění. Zmírňují, popřípadě odstraňují příznaky neklidu, halucinací a úzkosti. Také se používají pro zmírnění bolesti. Pro potlačení myoklonu se používají klonazepamy nebo valproáty. U extrapyramidových příznaků se používají tiapridy či melperony (RUSINA & MATĚJ, 2014; KROMBOLZ, 2015; GDOVINOVÁ, 2013). Jakmile onemocnění přejde do pokročilé až terminální fáze, je třeba zahájit paliativní léčbu. Velmi často se pacient v době určení diagnózy nachází v pokročilé fázi demence. Nastává tak velká komplikace s rozhodováním léčby, jelikož pacient sám nemá možnost rozhodnout o dalším postupu. V tomto případě se musí zvažovat názory lékařského týmu a příbuzných pacienta. Cílem léčby je prodloužení a zlepšení kvality života a zajištění důstojného umírání (RUSINA & MATĚJ, 2014; RUSINA & KOL., 2010).

7 PRAKTICKÁ ČÁST

Pro praktickou část jsme použili vzorky od 8 pacientů (3 žen a 5 mužů) s klinickým podezřením na prionové onemocnění. Všechny odebrané vzorky jsme použili z roku 2012 až 2015 s různě dlouhou dobou nemoci. V tabulce 3 (kap. 8.2) jsou shrnuta data o použitých biologických vzorcích. Všichni pacienti zemřeli ve věku nad 45 let.

Ke stanovení β – podjednotky proteinu 14-3-3 a likvorového tripletu jsme použili mozkomíšní mok, který byl odebraný lumbální punkcí vsedě či vleže dle standardního diagnostického postupu. Je velmi důležité, aby byly pro odběr a transport likvoru použity polypropylenové zkumavky. Vzorky dodané v den odběru a maximálně tři dny po něm se doporučuje převážet při teplotě 4 – 8 °C, pokud je transport plánován za delší časové období, je nutné vzorky zamrazit (-18 až -25 °C). V mrazu se pak také uchovávají do doby analýzy. Pro stanovení jsme nechali vytemperovat zmražené vzorky (-20 °C) na pokojovou teplotu. Ke stanovení koncentrace likvorového tripletu jsme použili komerčně dostupné kity INNOTEST β -amyloid, INNOTEST h-TAU Ag, INNOTEST p-TAU, které jsou založeny na principu metody ELISA. Výsledné hodnoty jsme porovnávali s fyziologickými hodnotami. Pro průkaz proteinu 14-3-3 jsme použili separační metodou elektroforézu v polyakrylamidovém gelu a Western blot s chemiluminiscenční detekcí.

Pro potvrzení či vyloučení definitivní diagnózy prionového onemocnění byla po úmrtí pacienta provedena autopsie. Pro stanovení přítomnosti PrP^{Res} byly použity vzorky nativní mozkové tkáně, konkrétně pravý frontotemporální lalok. Tento materiál je vysoce infekční, proto bylo důležité postupovat podle pokynů pro práci s priony. Na toto stanovení jsme použili metodu elektroforézu v polyakrylamidovém gelu a Western blot.

Všechny odebrané vzorky jsme analyzovali v Národní referenční laboratoři lidských prionových chorob v Thomayerově nemocnici v Praze. Tato laboratoř je díky bezpečnostním opatřením jako jediná v České republice vhodná pro vyšetření prionů.

7.1 Metody pro vyšetření likvoru a mozkové tkáně

7.1.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE)

I když je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu poměrně pracnou metodou, je hojně využívána v mnoha oborech. V tomto případě je využívána k vyšetření přítomnosti β -podjednotky 14-3-3 proteinu a prionového proteinu. PAGE je klasická metoda pro separaci proteinů, založená na rozdílném pohybu nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost proteinů závisí na jejich molekulové hmotnosti. PAGE využívá přítomnost detergentního činidla dodecylsulfátu sodného (SDS).

Polyakrylamidové gely jsou ideální pro separaci bílkovin, protože jsou chemicky inertní, neutrální, hydrofilní a transparentní pro optickou detekci. Gely jsou připraveny polymerací akrylamidového monomeru a činidla bis-akrylamidu, které vytvoří síťovou strukturu gelu. Polymerace je zahájena přidáním persulfátu amonného (APS), který pracuje jako katalyzátor reakce a dodává volné radikály. Přidáním roztoku N, N, N, N-tetramethylethylendiaminu (TEMED) se celá polymerizační reakce urychlí a stabilizuje. Do gelu se také přidává pufr pro stabilizaci hodnoty pH. Polyakrylamidové gely mohou být připraveny v různých koncentracích, čímž lze ovlivnit velikost pórů pro co nejlepší separaci molekul. Porozitu gelu můžeme vypočítat pomocí následujícího vzorce (ŠŤASTKOVÁ & KOL., 2012; BÁRTA & KOL., 2010; BIO-RAD, 2016).

Výpočet porozity gelu pro rozpětí molekulových hmotností:

$$\%T = \frac{\text{akrylamid} + \text{bis} - \text{akrylamid}}{\text{celk. objem}} \times 100$$

$$\%C = \frac{\text{bis} - \text{akrylamid}}{\text{akrylamid} + \text{bis} - \text{akrylamid}} \times 100$$

Ve výše uvedených vzorcích pak T % udává procentuální zastoupení akrylamidu a bis-akrylamidu, zatímco C % určuje procentuální zastoupení síťovacího činidla bis-akrylamidu. Hodnoty vypovídají, že se zvyšující se koncentrací akrylamidu a bis-akrylamidu se póry v gelu stahují, separace je

mnohem pomalejší a je tedy vhodnější pro separaci menších molekul (BÁRTA & KOL., 2010; BIO-RAD, 2016). Pro lepší rozlišení proteinů ve vzorku se separační gel převrství gelem zaostřovacím. Zaostřovací gel má nižší koncentraci (obsahuje větší póry) a jednotlivé vzorky se v něm při prostupování soustřeďují do úzké zóny na rozhraní mezi zaostřovacím a separačním gelem. K vlastní separaci proteinů dle velikosti molekuly pak dochází v separačním gelu. Takto připravené gely se vkládají do elektroforetické vany, jako elektrolyt pak slouží speciální pufr.

Do jamek, vytvořených pomocí hřebínků při přípravě gelu, se nanášejí připravené vzorky. Vzorek je předem smíchán se vzorkovým pufrem, který obsahuje barvivo pro zvýraznění vzorků a glycerol pro jejich zahuštění. Dále obsahuje SDS, který denaturuje protein na jednotlivé podjednotky a uděluje proteinům záporný náboj. Proteiny tak v zásaditém prostředí prostupují od katody k anodě a rozdělují se na základě molekulové hmotnosti. Větší molekuly urazí v gelu mnohem kratší vzdálenost než menší molekuly. Pro lepší identifikaci velikosti fragmentů se nanáší hmotnostní standard, tzv. ladder, s danými velikostmi fragmentů. Tímto způsobem lze určit relativní molekulovou hmotnost proteinů. Pro identifikaci proteinu je třeba použít protilátky, které se k analyzovanému proteinu specificky naváží. Nejprve je však potřeba proteiny přenést na vhodný materiál, na kterém je jejich detekce snadno proveditelná. Tento způsob se provádí metodou Western blot (ŠŤASTKOVÁ & KOL., 2012; BÁRTA & KOL., 2010; BIO-RAD, 2016).

7.1.2 Western blot (WB)

Western blot je citlivá technika, díky které je možné ve vzorcích identifikovat specifické proteiny. Tato metoda se skládá ze dvou klíčových kroků. Prvním krokem je metoda PAGE, o které je zmíněno v předešlé kapitole 7.1.1. Ve druhém kroku dochází k vlastnímu přenosu proteinů, neboli „blotování“ (MAHMOOD & YANG, 2012).

Separované proteiny se v blotovacím zařízení přenesou z gelu na nitrocelulózovou membránu pomocí elektrického pole. Mohou se používat i jiné membrány, jako je například polyvinylidendifluoridová nebo na nylonové bázi (SCIENCE, 2011).

Pro přenos proteinů na membránu se připraví tzv. sandwich uspořádání, které je sestaveno následovně: filtrační papír – nitrocelulózová membrána – gel – filtrační papír. Vše musí být poskládáno tak, aby nitrocelulózová membrána směřovala ke kladné elektrodě a gel k záporné elektrodě. Membrána i filtrační papíry jsou navlhčené přenosovým pufrům, který slouží jako elektrolyt. Přenáší negativně nabitě proteiny z gelu na membránu směrem k anodě a kopíruje jejich migrační pozice v gelu. Tento typ přenosu je prováděn za polosuchých podmínek v horizontální poloze. Přenos proteinů je poměrně rychlý a spotřeba přenosového pufru je malá. Také má tento přenos mnohem lepší retenční schopnosti (MAHMOOD & YANG, 2012; SCIENCE, 2011). Další možnou variantou je přenos proteinů za mokřých podmínek. Tyto podmínky jsou mnohem spolehlivější, protože nedochází k vysušení gelu, a jsou vhodnější pro větší velikost proteinů. Nevýhodou tohoto přenosu je velká spotřeba pufru. „Sandwich“ uspořádání mokrého přenosu se od uspořádání polosuchého liší v tom, že obsahuje více vrstev: houba – filtrační papír – nitrocelulózová membrána – gel – filtrační papír – houba. Toto uspořádání je navíc vloženo do speciální kazety a zcela ponořeno v přenosovém roztoku. Vana s roztokem je připojena ke chladicímu zařízení (SCIENCE, 2011; THERMOFISHER, 2015a).

Obrázek 5: Schématické uspořádání polosuchého přenosového systému v horizontální poloze



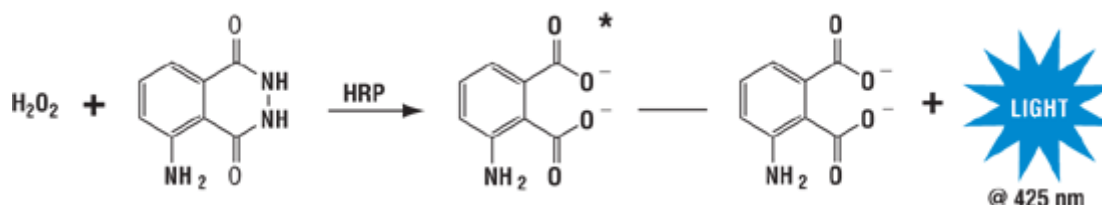
Převzato a upraveno z <http://www.bio-rad.com/en-cz/applicationstechnologies/protein-blotting-methods> [2016-06-26].

Následujícím, velmi důležitým krokem je blokace, která zamezuje nespecifické vazbě protilátek na membránu. Jako blokovací roztok se nejčastěji používá 5 % roztok BSA či sušené odtučněné mléko rozpuštěné v T-PBS. T-PBS je fyziologický roztok pufovaný fosforečnanem s přidáním Tweenu. Blokovací roztoky by měli snížit interferenci na pozadí a tím zlepšit citlivost testu a poměr signálu k šumu. Blokovací roztok se sušeným odtučněným mlékem je cenově velmi výhodný, snadno dostupný a dává čisté pozadí. Nevýhodou T-PBS roztoku je možnost zamaskování některých antigenů (MAHMOOD & YANG, 2012; SCIENCE, 2011; THERMOFISHER, 2015a).

Ke stanovení příslušného proteinu se musí použít taková primární protilátka, která příslušný antigen rozpozná. Jednotlivé kroky inkubace jsou prokládány promýváním. To je nezbytné pro odstranění nenavázaných reakčních činidel a zajištění nižší interference pozadí a vyšší čistoty signálu (SCIENCE, 2011; THERMOFISHER, 2015a). Pro vizualizaci je třeba použít sekundární protilátku, která je značená enzymem, jenž signál reakce zesílí. V našem případě se používá enzym křenová peroxidáza (HRP). Výhodou tohoto enzymu je nízká cena, dobrá stabilita, široká dostupnost (výběr) substrátu, ale hlavně vysoká enzymová aktivita. Jako druhý enzym se používá alkalická fosfatáza, která má stejné využití jako HRP pro chromogenní, chemiluminiscenční a fluorogenní substráty (SCIENCE, 2011; THERMOFISHER, 2015a).

Posledním částí Western blotu je detekce. Do reakce je přidán chemiluminiscenční substrát, který reaguje s enzymem specificky navázaným na sekundární protilátku. Chemiluminiscenční substrát se stává nestabilním, emituje fotony, aby dosáhly základního excitačního stavu, a tím dochází k vyzařování chemiluminiscenčního světla. Uvolněné světlo je detekováno CCD kamerou či na rentgenovém filmu. Intenzita signálu je přímo úměrná množství detekovaného proteinu.

Obrázek 6: Chemiluminiscenční reakce



Oxidace luminolu peroxidem vodíku v přítomnosti enzymu HRP za vzniku 3-aminoftalátu v excitovaném stavu. Tento produkt se rozkládá při uvolnění fotonů světla do energeticky nižšího stavu.

Převzato z <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-western-blotting.html> [2016-06-15].

Výhodou chemiluminiscenční detekce je vícenásobná expozice, díky které je možné dosáhnout nejlepšího výsledku. Umožňuje tak kvantifikaci pro velký rozsah koncentrací a dává největší citlivost ze všech detekčních metod. (THERMOFISHER, 2015b; SCIENCE, 2011; MAHMOOD & YANG, 2012).

7.1.3 ELISA

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je široce využívaná heterogenní imunochemická metoda, která je založená na jednoduchém imunoenzymatickém principu pro detekci a kvantifikaci protilátky či antigenu. ELISA metody jsou považovány za vysoce citlivé a specifické.

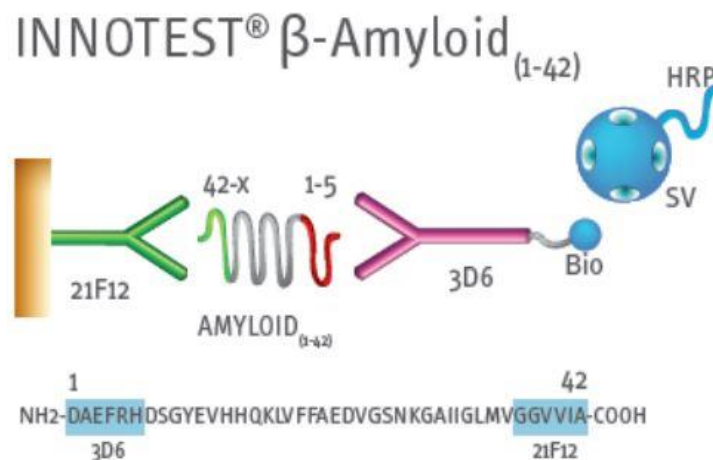
Principem metody je interakce antigenu se specifickou protilátkou. Pevná fáze je pokryta specifickou protilátkou či antigenem. Po nanesení vzorku obsahujícího neznámé množství měřeného antigenu či protilátky vzniká imunokomplex. Na něj se v dalším kroku váže detekční sekundární protilátka, na kterou je kovalentně navázán enzym. Nejčastěji používanými enzymy jsou křenuvá peroxidáza a alkalická fosfatáza. Sekundární protilátky mají mnoho výhod: zvyšují citlivost, což umožňuje zvýšení signálu, je k dispozici široký výběr protilátek a jejich použitím si primární protilátka zachovává maximální imunoreaktivitu. Jednotlivé kroky postupu jsou prokládány promytím, čímž

dochází k odstranění nenavázaných antigenů a nadbytku protilátky. Promytím se myslí opakované plnění a odsátí jamek mikrotitrační destičky promývacím roztokem. Pokud je promývání nedostatečné, může dojít k vysokému signálu pozadí, čímž se snižuje poměr signálu k šumu. Po posledním promytí je přidán chromogenní substrát organického či anorganického charakteru (o-fenylendiamin, tetramethylbenzidin a jiné). Substrát specificky reaguje s enzymem za vzniku reakce provázené barevnou změnou. Následně je reakce zastavena přidáním STOP roztoku obsahujícím kyselinu. Intenzita signálu je měřena spektrofotometricky.

Metoda ELISA má celou řadu modifikací. Antigen či protilátku můžeme detekovat přímou či nepřímou metodou, nekompetitivní „sandwich“ metodou, kompetitivní či capture metodou. Každou tuto metodu lze použít jak pro hodnocení kvantitativní (použití kalibrační křivky), tak i pro kvalitativní (tzv. cut-off) (SCIENTIFIC, 2015; GAN & PATEL, 2013).

Pro stanovení koncentrace β -amyloidu, h-TAU a p-TAU proteinu jsme použili kompletní ELISA kity – INNOTEST. V následujícím textu uvedu stanovení β -amyloidu v mozkomíšním moku na principu „sandwich“ metody. Na monoklonální protilátku 21F12 (IgG2a), která je vázaná na pevný nosič, se naváže β -amyloid (antigen) ze vzorku mozkomíšního moku. Pro nepřímou detekci antigenu je po inkubaci přidána sekundární protilátka 3D6 (IgG2b), která je značená biotinem. Jednotlivé kroky jsou prokládány promytím jamek mikrotitrační destičky promývacím roztokem. Používá se fyziologický roztok pufovaný fosforečnanem. Přidáním enzymu křenové peroxidázy značené streptavidinem a substrátu tetramethylenbenzidinu dochází k chemické reakci, která se projeví změnou barvy roztoku, konkrétně z čiré na modrou barvu. Po přidání STOP roztoku, obsahujícího kyselinu sírovou, se modrá barva roztoku změní na žlutou. Měří se intenzita zbarvení tohoto roztoku spektrofotometricky při 450 nm. Intenzita výsledného zbarvení je přímo úměrná koncentraci stanoveného β -amyloidu (antigenu). Výpočtem z kalibrační křivky získáme koncentraci β -amyloidu ve vzorku (FUJIREBIO, 2015).

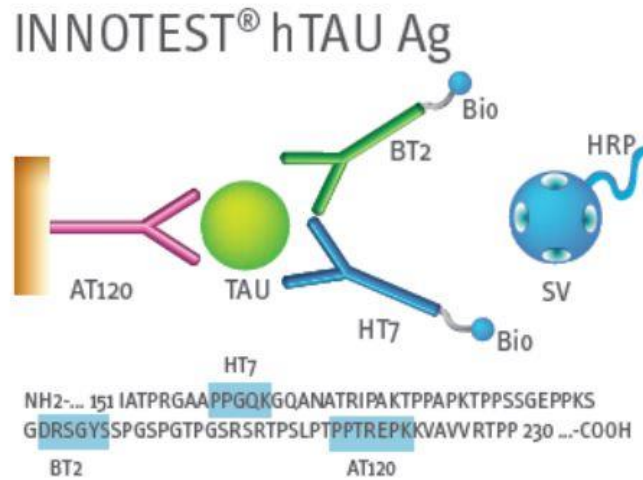
Obrázek 7: Princip INNOTESTU β -amyloid (1-42)



Převzato z <https://www.fujirebio-europe.com/products-services/product-browser/innotestr-v-amyloid1-42> [2016-06-16].

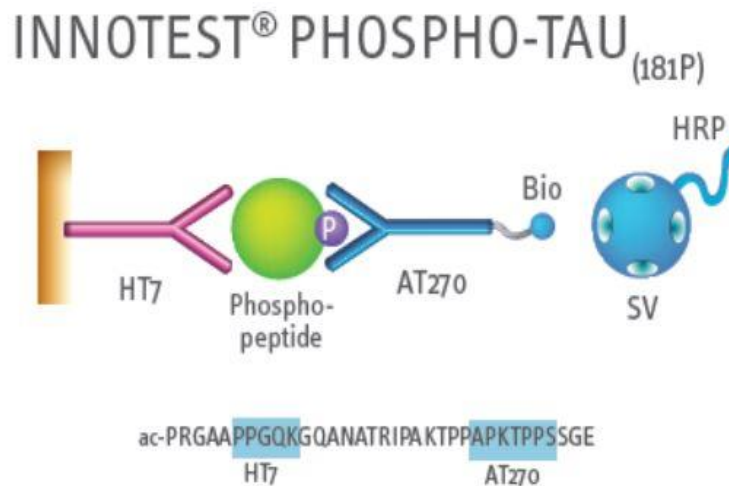
Princip metody pro stanovení proteinů p-TAU a h-TAU je stejný. Liší se však použitými primárními a sekundárními protilátkami. Pro stanovení proteinu h-TAU je na pevném nosiči navázaná primární protilátka AT120 (IgG1), sekundární protilátky jsou v tomto případě dvě, a to HT7 (IgG1) a BT2 (IgG1). V případě stanovení proteinu p-TAU je na pevném nosiči navázaná primární protilátka HT7 (IgG1), jako sekundární protilátka je použita AT270 (IgG1) (FUJIREBIO, 2015; SCIENTIFIC, 2015).

Obrázek 8: Princip INNOTESTU h-TAU



Převzato z <https://www.fujirebio-europe.com/products-services/productbrowser/innotestr-htau-ag-2> [2016-06-16].

Obrázek 9: Princip INNOTESTU p-TAU_(181p)



Převzato z <https://www.fujirebio-europe.com/products-services/productbrowser/innotestr-phospho-tau181p-1> [2016-06-16].

7.2 Vyšetření přítomnosti β – podjednotky 14-3-3 proteinu

Materiál

- mozkomíšní mok

Pomůcky a přístroje

- odměrné válce, kádinky, pipety, Petriho misky
- mikroskopavky, špičky, stojánky
- buničina, papírová destička, filtrační papír, potravinová folie, nitrocelulózová membrána
- nůžky, pinzety
- automatické pipety (Finpipette, Biohit)
- nádoba na ELFO, zdroj elektrického proudu (BioRad)
- přístroj na blotování (Semidry blot, v. č.: 221BR34948)
- třepačka (Biosan, v. č.: 010152-1202-0127)
- vortex (Bio Vortex V1, v. č.: 580610005)
- kazeta na rentgenový film, rentgenový film (Fujifilm), vyvolávací automat (Chirana)
- lednice, mrazák

Reagencie

- Novex[®] Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x) (= vzorkový pufr)
- SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Protein Standard (= ladder)
- Running pufr, lékárna (50 ml running pufru + 450 ml destilované vody)
- Transfer pufr, lékárna (100 ml transfer pufru + 200 ml metanolu + 700 ml destilované vody)
- T-PBS pufr, lékárna (1 l PBS + 1 ml Tween 20)
- 5% roztok odtučněného mléka (10 g sušeného odtučněného mléka + 200 ml T-PBS pufru)
- 14-3-3 β (K19), Santa Cruz Biotechnology
- Goat anti-mouse IgG (H+L), Jackson Immuno Research Laboratories
- Pierce[®] ECL Plus Western Blotting Substrate (= ECL pufr a činidlo)
- vývojka a ustalovač (Anatomix, fa. Fuji Hunt)

Polyakrylamidový gel (tloušťka 1,5mm)

- použili jsme čerstvě připravený 10% amonium persulfát (0,1g APS + 1 ml destilované vody)

Příprava dvou gelů:

Separční gel (12%)

Destilovaná voda	5,025 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,75 ml
10% roztok SDS	150 µl
30% bis-akrylamid	6 ml
10% APS	150 µl
TEMED	7,5 µl

- gel jsme nalili mezi dvě sklíčka do požadované výšky, převrstvili etanolem a nechali přibližně 30 min tuhnout

Zaostřovací gel (4%)

Destilovaná voda	9,15 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	3,75 ml
10% roztok SDS	150 µl
30% bis-akrylamid	2 ml
10% APS	150 µl
TEMED	15 µl

- po ztuhnutí separčního gelu jsme etanol vylili, doplnili prostor mezi sklíčky zaostřovacím gelem, vložili hřebínky a nechali gel ztuhnout

Pracovní postup

1. Příprava vzorku

- k 25 μ l vzorkového pufru jsme pomalu přidávali 75 μ l vzorku

2. ELFO

- připravili jsme si ELFO nádobu s gely o tloušťce 1,5 mm
- do této nádoby jsme nalili running pufr
- nanесли jsme 40 μ l připraveného vzorku, 40 μ l PK, 10 μ l ladderu
- nastavili jsme na zdroji napětí 80 V a nechali běžet 30 min
- poté jsme napětí zvýšili na 100 V a nechali běžet 1 – 1,5 hod (čelo 0,5 cm ode dna)

3. WB

- do blotovacího zařízení jsme přenesli připravený „sandwich“ (filtrační papír – membrána – gel – filtrační papír)
- nastavili jsme na zdroji napětí 9 V a nechali běžet 1 hod

4. Blokace

- poté jsme membránu přenesli do 5% roztoku odtučněného mléka a nechali blokovat 1 hod při pokojové teplotě za stálého třepání

5. Inkubace s primární protilátkou

- do Petriho misky jsme napipetovali 20 ml 5% roztoku odtučněného mléka a 20 μ l primární protilátky 14-3-3 β (K19)
- nechali jsme inkubovat do druhého dne v lednici
- druhý den jsme membránu promyli 2x po 8 min 5% roztokem odtučněného mléka
- poté jsme membránu opláchli T-PBS puftrem a následně promyli 2x po 10 min v T-PBS pufru

6. inkubace se sekundární protilátkou

- do jiné Petriho misky jsme napipetovali 20 ml 5% roztoku odtučněného mléka a 20 μ l sekundární protilátky IgG-HRP

- nechali jsme inkubovat 1 hod při pokojové teplotě za stálého třepání
- poté jsme membránu promyli 2x po 8 min 5% roztokem odtučněného mléka
- následně jsme membránu opláchli T-PBS a promyli 2x po 12 min v T-PBS

7. Detekce

- membránu jsme osušili ve filtračním papíře
- následně jsme membránu vložili do připravené Petriho misky naplněné 5 ml ECL pufru a 125 μ l ECL činidla a třepali v ruce 3 min
- vše jsme prováděli v přítmí

8. Expozice

- osušenou membránu jsme položili na papírovou destičku a zabalili do potravinové folie
- v temné komoře jsme nechali membránu exponovat na rentgenový film po dobu 1 min, 2 min, 3 min, 5 min a 7 min
- poté jsme vyvolali rentgenový film ve vyvolávacím automatu

7.3 Vyšetření přítomnosti prionového proteinu

Materiál

- nativní mozková tkáň (pravý frontotemporální lalok)

Pomůcky a přístroje

- odměrný válec, kádinky, pipety, Petriho misky
- polystyrenové zkumavky, mikrozukavky, špičky, stojánky
- buničina, papírová destička, filtrační papír, potravinová folie, nitrocelulózová membrána
- nůžky, pinzety, skalpel
- automatické pipety (Finpipette, Biohit)
- nádoba na ELFO, zdroj elektrického proudu (BioRad)
- přístroj na blotování (Semidry blot, v. č.: 221BR34948)

- třepačka (Biosan, v. č.: 010152-1202-0127)
- vortex (Bio Vortex V1, v. č.: 580610005)
- váha (Boeco, v. č.: 18406633)
- termoblok (Biosan TDB-100, v. č.: 670701011)
- homogénizátor (Ultra Turrax, v. č.: 441267)
- biohazard box (Jouan, v. č.: NFX 44-201)
- kazeta na rentgenový film, rentgenový film (Fujifilm), vyvolávací automat (Chirana)
- lednice, mrazák

Reagencie

- Prionics®-Check WESTERN, Prionics® (*trávicí pufr, proteáza K, roztok k zastavení trávení*)
- SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard (= ladder)
- Running pufr, lékárna (*50 ml running pufru + 450 ml destilované vody*)
- Transfer pufr, lékárna (*100 ml transfer pufru + 200 ml metanolu + 700 ml destilované vody*)
- T-PBS pufr, lékárna (*1 l PBS + 1 ml Tween 20*)
- 5% roztok odtučněného mléka (*10 g sušeného odtučněného mléka + 200 ml T-PBS pufru*)
- Anti Prion Protein Monoclonal Antibody 12F10, SPIbio (= 12F10)
- Monoclonal Antibody 6H4, Prionics® (= 6H4)
- Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP, DakoCytomation (= DAKO)
- Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate (*ECL pufr a činidlo*)
- ředící roztok na vzorky tkání, lékárna
- vývojka a ustalovač (Anatomix, fa. Fuji Hunt)

Polyakrylamidový gel (*tloušťka 1 mm*)

- použili jsme čerstvě připravený 10% amonium persulfát (*0,1g APS + 1 ml destilované vody*)

Příprava dvou gelů:

Separční gel (12%)

Destilovaná voda	3,35 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml
10% roztok SDS	100 μ l
30% bis-akrylamid	4 ml
10% APS	100 μ l
TEMED	5 μ l

- gel jsme nalili mezi dvě sklíčka do požadované výšky, převrstvili etanolem a nechali přibližně 30 min tuhnout

Zaostřovací gel (4%)

Destilovaná voda	6,1 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
10% roztok SDS	100 μ l
30% bis-akrylamid	1,33 ml
10% APS	100 μ l
TEMED	10 μ l

- po ztuhnutí separčního gelu jsme etanol vylili, doplnili prostor mezi sklíčky zaostřovacím gelem, vložili hřebínky a nechali gel ztuhnout

Pracovní postup

1. Příprava vzorku

- připravili jsme 10% homogenát mozkové tkáně: např. k 0,3 g šedé hmoty mozkové jsme přidali 3 ml extrakčního pufru a 1 min jsme homogenizovali
- do mikrozkušavky jsme napipetovali 100 μ l homogenátu a přidali 10 μ l trávicího pufru a 10 μ l proteázy K

- vše jsme dobře promíchali na vortexu a nechali inkubovat v termobloku při 50 °C 40 min
- poté jsme ke vzorku přidali 10 µl roztoku k zastavení trávení a opět promíchali
- dále jsme k tomuto vzorku přidali 100 µl ředícího pufru pro PAGE
- opět jsme vše promíchali a nechali jsme inkubovat v termobloku při 96 °C 5 min

2. ELFO

- připravili jsme si ELFO nádobu s gely o tloušťce 1 mm
- do této nádoby jsme nalili running pufr
- nanесли jsme 10 µl připraveného vzorku, 10 µl PK, 10 µl NK a 10 µl ladderu
- nastavili jsme na zdroji napětí 200 V a nechali běžet 35 – 40 min (čelo asi 0,5 cm ode dna)

3. WB

- do blotovacího zařízení jsme přenesli připravený „sandwich“ (filtrační papír – membrána – gel – filtrační papír)
- nastavili na zdroji napětí 12 V a nechali běžet 1 hod

4. Blokace

- poté jsme membránu přenesli do 5% roztoku odtučněného mléka
- nechali jsme blokovat 1 hod při pokojové teplotě za stálého třepání

5. Inkubace s primární protilátkou

- do Petriho misky jsme napipetovali 10 ml T-PBS pufru, 5 µl primární protilátky 12F10 a vložili do ní první membránu
- do druhé Petriho misky jsme napipetovali 10 ml T-PBS pufru, 1,1 µl primární protilátky 6H4 a vložili druhou membránu
- obě membrány jsme nechali inkubovat 1 hod při pokojové teplotě za stálého třepání
- následně jsme vzorky promyli 3x po 5 min v T-PBS pufru

6. Inkubace se sekundární protilátkou

- po promytí jsme do první Petriho misky (*pro 12F10*) napipetovali 10 ml T-PBS pufru a 8 μ l sekundární kozí protilátky DAKO
- do druhé misky (*pro 6H4*) jsme napipetovali 12 ml T-PBS pufru a 2 μ l sekundární kozí protilátky DAKO
- membrány jsme nechali inkubovat 45 min při pokojové teplotě za stálého třepání
- následně promyli 5x po 5 min T-PBS pufrům

7. Detekce

- obě membrány jsme osušili ve filtračním papíře
- následně jsme membrány vložili do připravené Petriho misky naplněné 5 ml ECL pufru a 125 μ l ECL činidla a třepali v ruce 3 min
- vše jsme prováděli v přítmí

8. Expozice

- osušené membrány jsme položili na papírovou destičku a zabalili do potravinové folie
- v temné komoře jsme nechali membránu exponovat na rentgenový film po dobu 30 s, 1 min, 2 min, 3 min
- poté jsme vyvolali rentgenový film ve vyvolávacím automatu

7.4 Stanovení koncentrace β -amyloidu

Materiál

- mozkomíšní mok

Pomůcky a přístroje

- odměrné válce, kádinky, pipety, Petriho misky
- mikrozumavky, špičky, stojánky
- buničina
- automatické pipety (Finpipette, Biohit)

- vortex (Bio Vortex V1, v. č.: 580610005)
- třepačka (Titertek, v. č.: 541307)
- termostat (Binder, v. č.: 15-03048)
- promývačka (Dynawash-E, v. č.: 3107-0025)
- vertikální kolorimetr (ELISA reader ELX 800, v. č.: 199061)
- software KC junior/KC4
- lednice, mrazák

Reagencie

- INNOTEST β -AMYLOID₍₁₋₄₂₎, Fujirebio, Inc., kat. č.: 81576, č. š.: 401000, exp.:5-2016
- A β ₍₁₋₄₂₎ CAL-RVC pack, Fujirebio, Inc., kat. č.: 81577, č. š.: 401023

Pracovní postup

- do každé jamky jsme napipetovali 75 μ l pracovního roztoku K1 (45 μ l konjugátu 1 + 4,5 ml diluentu konjugátu 1)
- dále jsme napipetovali 25 μ l vzorků, validačních kontrol, kalibrátorů a IKK
- destičku jsme poté protřepali a nechali inkubovat 60 min při teplotě 25 °C \pm 2 °C
- následně jsme jamky 5x promyli promývacím roztokem (10 ml promývacího roztoku + 240 ml destilované vody) a osušili vyklepnutím zbylého roztoku
- do každé jamky jsme napipetovali 100 μ l pracovního roztoku K2 (60 μ l konjugátu 2 + 6 ml diluentu konjugátu 2)
- destičku jsme protřepali a nechali inkubovat 30 min při 25 °C \pm 2 °C
- opět jsme jamky 5x promyli promývacím roztokem a osušili vyklepnutím zbylého roztoku
- následně jsme do každé jamky napipetovali 100 μ l substrátu S (60 μ l substrátu TMB + 6 ml substrátového pufu), protřepali a nechali inkubovat ve tmě 30 min při 25 °C \pm 2 °C
- přidáním 50 μ l STOP roztoku do každé jamky jsme zastavili reakci a změřili jsme intenzitu zbarvení při 450 nm

7.5 Stanovení koncentrace proteinu h-TAU

Materiál

- mozkomíšní mok

Pomůcky a přístroje

- odměrné válce, kádinky, pipety, Petriho misky
- mikrozkuhavky, špičky, stojánky
- buničina
- automatické pipety (Finpipette, Biohit)
- vortex (Bio Vortex V1, v. č.: 580610005)
- třepačka (Titertek, v. č.: 541307)
- termostat (Binder, v. č.: 15-03048)
- promývačka (Dynawash-E, v. č.: 3107-0025)
- vertikální kolorimetr (ELISA reader ELX 800, v. č.: 199061)
- software KC junior/KC4
- lednice, mrazák

Reagencie

- INNOTEST hTAU Ag, Fujirebio, Inc., kat. č.: 81572, č. š.: 401603, exp.: 7-2016
- Tau Ag CAL-RVC pack, Fujirebio, Inc., kat. č.: 81573, č. š.: 401605

Pracovní postup

- do každé jamky jsme napipetovali 75 μ l pracovního roztoku K1 (45 μ l konjugátu 1 + 4,5 ml diluentu konjugátu 1)
- dále jsme napipetovali 25 μ l vzorků, validačních kontrol, kalibrátorů a IKK
- destičku jsme poté protřepali a nechali inkubovat přes noc při teplotě 25 °C \pm 2 °C
- na druhý den jsme jamky 5x promyli promývacím roztokem (10 ml promývacího roztoku + 240 ml destilované vody) a osušili vyklepnutím zbylého roztoku

- do každé jamky jsme napipetovali 100 μ l pracovního roztoku K2 (60 μ l konjugátu 2 + 6 ml diluentu konjugátu 2)
- destičku jsme protřepali a nechali inkubovat 30 min při 25 °C \pm 2 °C
- opět jsme jamky 5x promyli promývacím roztokem a osušili vyklepnutím zbylého roztoku
- následně jsme do každé jamky napipetovali 100 μ l substrátu S (60 μ l substrátu TMB + 6 ml substrátového pufu), protřepali a nechali inkubovat ve tmě 30 min při 25 °C \pm 2 °C
- přidáním 50 μ l STOP roztoku do každé jamky jsme zastavili reakci a změřili jsme intenzitu zbarvení při 450 nm

7.6 Stanovení koncentrace proteinu p-TAU

Materiál

- mozkomíšní mok

Pomůcky a přístroje

- odměrné válce, kádinky, pipety, Petriho misky
- mikrozkušavky, špičky, stojánky
- buničina
- automatické pipety (Finpipette, Biohit)
- vortex (Bio Vortex V1, v. č.: 580610005)
- třepačka (Titertek, v. č.: 541307)
- termostat (Binder, v. č.: 15-03048)
- promývačka (Dynawash-E, v. č.: 3107-0025)
- vertikální kolorimetr (ELISA reader ELX 800, v. č.: 199061)
- software KC junior/KC4
- lednice, mrazák

Reagencie

- INNOTEST PHOSPHO-TAU_(181P), Fujirebio, Inc., kat. č.: 81574, č. š.: 401697, exp.: 10-2016
- Phospho-Tau CAL-RVC pack, Fujirebio, Inc., kat. č.: 81575, č. š.: 401699

Pracovní postup

- do každé jamky jsme napipetovali 25 μ l pracovního roztoku K1 (25 μ l konjugátu 1 + 2,5 ml diluentu konjugátu 1)
- dále jsme napipetovali 75 μ l vzorků, validačních kontrol, kalibrátorů a IKK
- destičku jsme poté protřepali a nechali inkubovat přes noc v lednici při teplotě 2 – 8 °C
- na druhý den jsme jamky 5x promyli promývacím roztokem (10 ml promývacího roztoku + 240 ml destilované vody) a osušili vyklepnutím zbylého roztoku
- do každé jamky jsme napipetovali 100 μ l roztoku K2 (60 μ l konjugátu 2 + 6 ml diluentu konjugátu 2)
- mikrotitrační destičku jsme protřepali a nechali inkubovat 60 min při 25 °C \pm 2 °C
- opět jsme jamky 5x promyli promývacím roztokem a osušili vyklepnutím zbylého roztoku
- následně jsme do každé jamky napipetovali 100 μ l roztoku substrátu S (60 μ l substrátu TMB + 6 ml substrátového pufru), protřepali a nechali inkubovat ve tmě 30 min při 25 °C \pm 2 °C
- přidáním 50 μ l STOP roztoku do každé jamky jsme zastavili reakci a změřili jsme intenzitu zbarvení při 450 nm

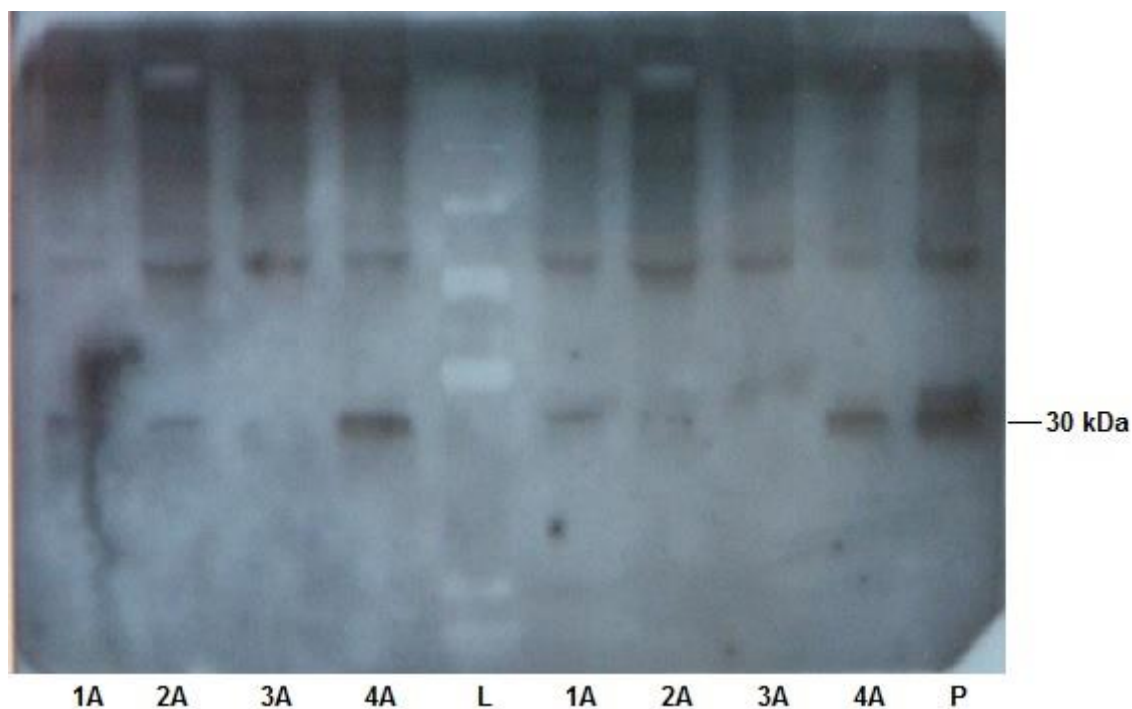
8 VÝSLEDKY

8.1 Vyšetření přítomnosti β – podjednotky 14-3-3 proteinu

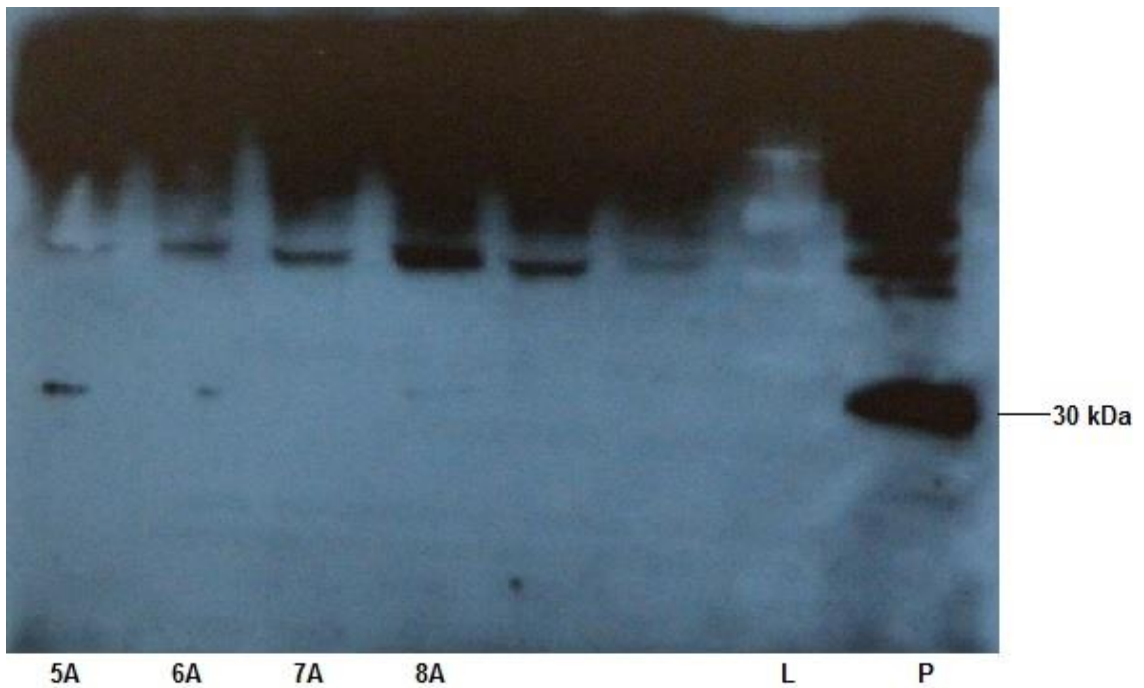
U osmi případů jsme vyšetřovali přítomnost proteinu 14-3-3 z likvoru, který byl odebraný *ante mortem* a *post mortem*. Stanovení jsme provedli metodou Western blot za použití primární protilátky 14-3-3 β (K19) a sekundární protilátky IgG-HRP. Membránu jsme exponovali na rentgenový film po dobu 1 min, 2 min, 3 min, 5 min a 7 min. Na obrázku níže (obr. 10a) je patrné, že vzorky odebrané *ante mortem* č. 1 a 2 jsou slabě pozitivní, vzorek č. 3 je negativní a vzorek č. 4 je silně pozitivní. Vyšetření vzorků bylo provedeno v duplikátu s pozitivní kontrolou (P) a markerem molekulových hmotností (L). Na druhém obrázku (obr. 10b) jsou uvedeny výsledky vzorků č. 5 – 8 odebrané taktéž *ante mortem*. Jednoznačně pozitivní výsledek je ve vzorku č. 5, vzorky č. 6 a 8 jsou slabě pozitivní, negativní výsledek je u vzorku č. 7.

Obrázek 10: Vyšetření vzorků odebraných *ante mortem*

a) Expozice 7. min, vzorky značené 1A – 4A



b) Expozice 2. min, vzorky značené 5A – 8A



Vysvětlivky: 1 – 8 vzorky

A *ante mortem*

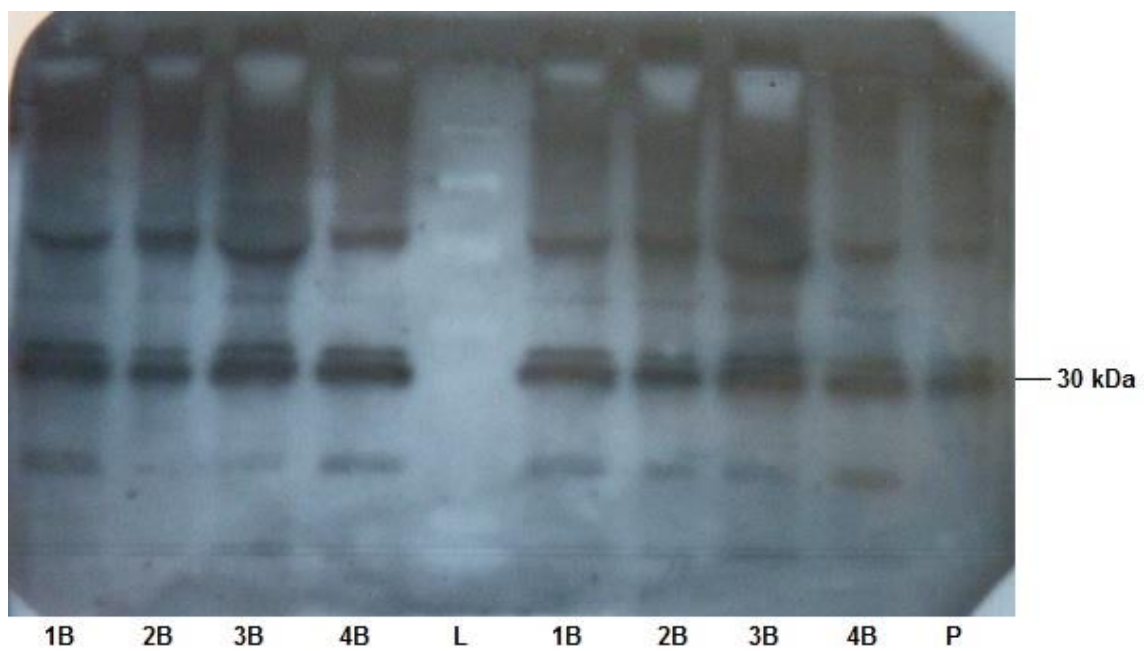
L marker molekulových hmotností „ladder“

P pozitivní kontrola

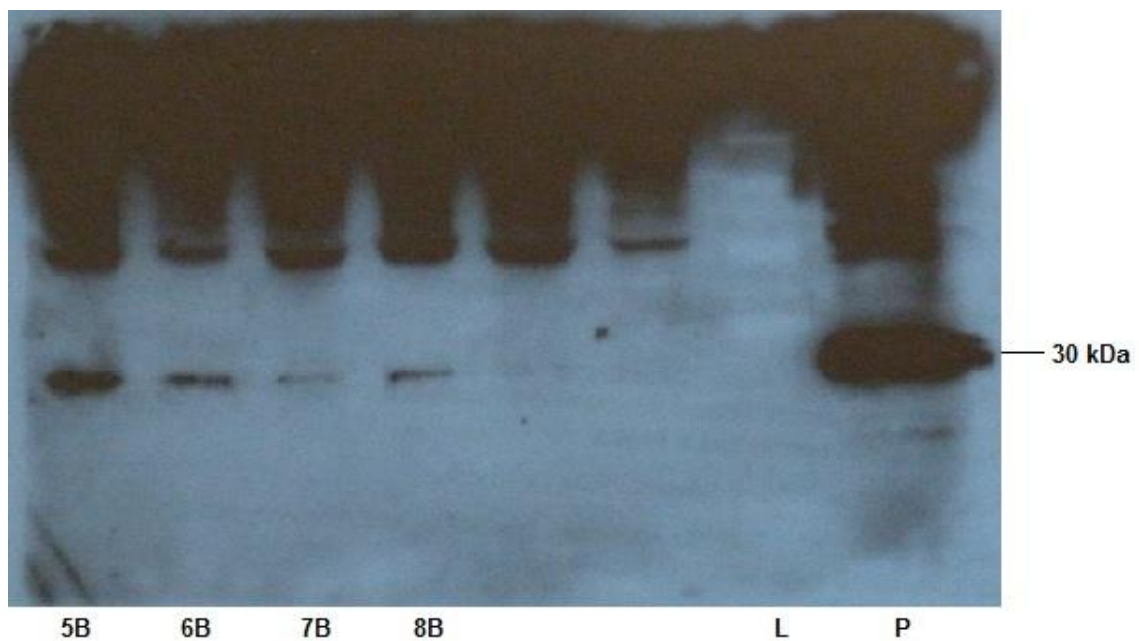
Výsledky vyšetření všech vzorků mozkomíšního moku odebraných *post mortem* jsou na přítomnost proteinu 14-3-3 pozitivní.

Obrázek 11: Vyšetření vzorků odebraných post mortem

a) Expozice 7. min, vzorky značené 1B – 4B



b) Expozice 2. min, vzorky značené 5B – 8B



Vysvětlivky: 1 – 8 vzorky

B *post mortem*

L marker molekulových hmotností „ladder“

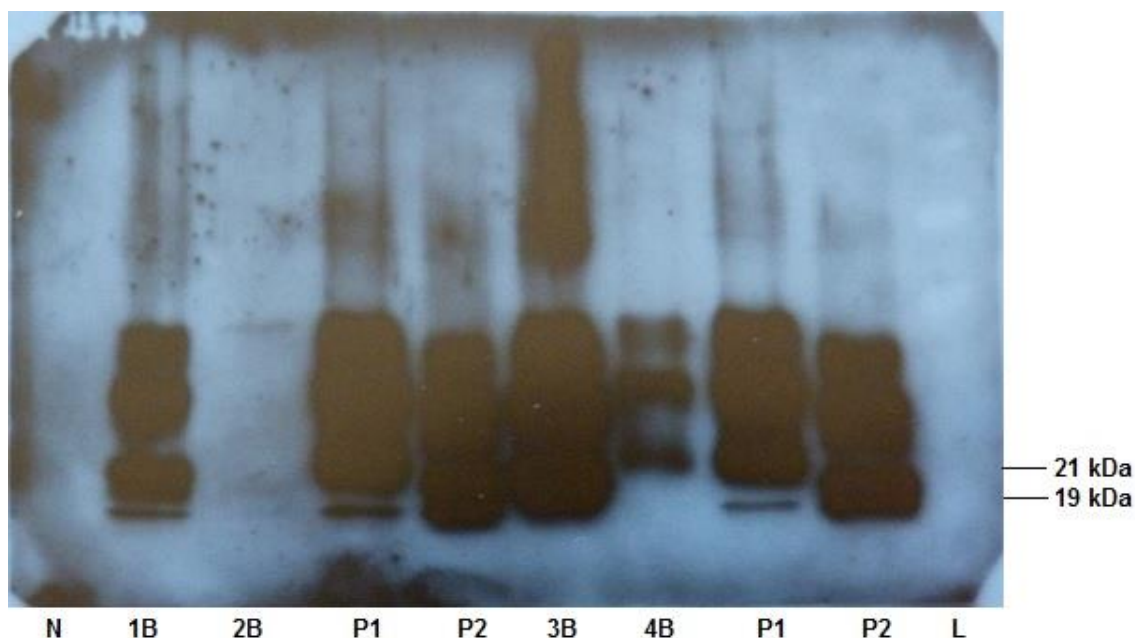
P pozitivní kontrola

8.2 Vyšetření přítomnosti prionového proteinu

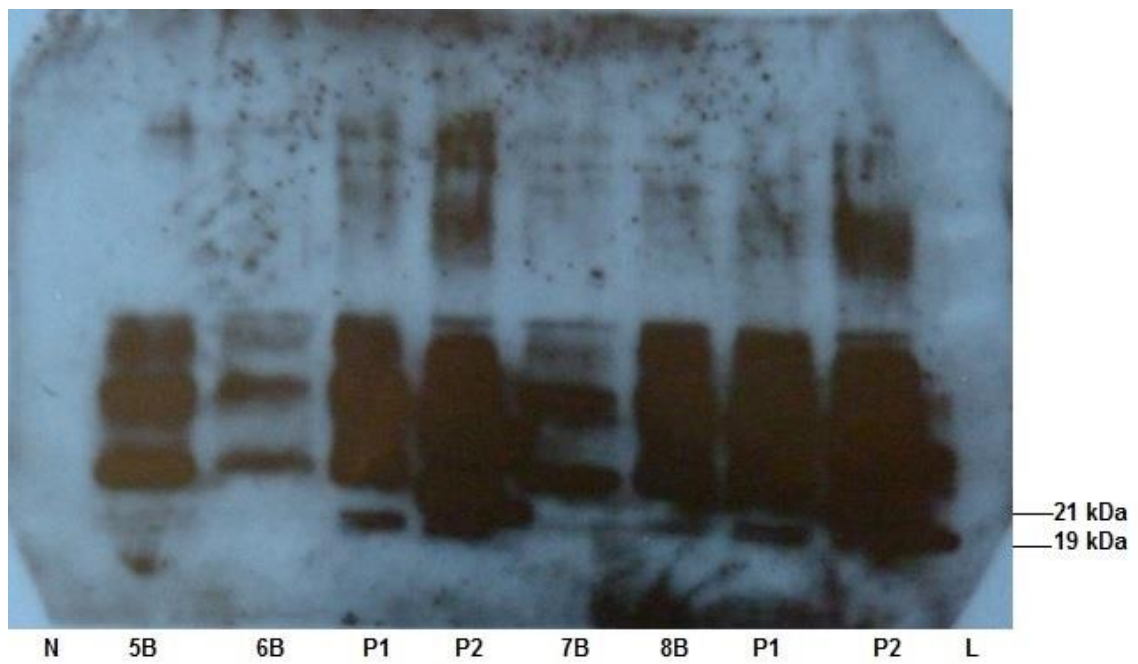
Vyšetření přítomnosti patogenní formy prionového proteinu v mozkové tkáni jsme provedli metodou Western blot za použití dvou primárních protilátek (12F10 a 6H4) a jedné sekundární protilátky (IgG-HRP). V tomto případě jsme nechali membránu exponovat na rentgenový film po dobu 30s, 1 min, 2 min a 3 min. Ke stanovení jsme použili pozitivní (P1, P2) a negativní kontrolu (N) a marker molekulových hmotností (L). Po detekci protilátkou 12F10 (viz obr. 12a, b) byly všechny vzorky č. 1B – 8B pozitivní, vyjma vzorku č. 2B, který byl negativní. Po detekci protilátkou 6H4 (viz obr. 13a, b) byly všechny vzorky pozitivní, vzorek č. 2B byl slabě pozitivní. U vzorků č. 2B, 4B, 7B a 8B jsme prokázali sporadickou formu CJN u homozygotních pacientů, což vypovídá o typu 1 s molekulovou hmotností (21 kDa). U zbývajících vzorků č. 1B, 3B, 5B a 6B jsme analyzovali typ 2A s nižší molekulovou hmotností (19 kDa) sporadické formy homozygotních pacientů.

Obrázek 12: Vyšetření prionů – detekce protilátkou 12F10

a) Expozice 30 s, vzorky značené 1B – 4B



b) Expozice 1. min, vzorky značené 5B – 8B



Vysvětlivky: 1 – 8 vzorky

B *post mortem*

L marker molekulových hmotností „ladder“

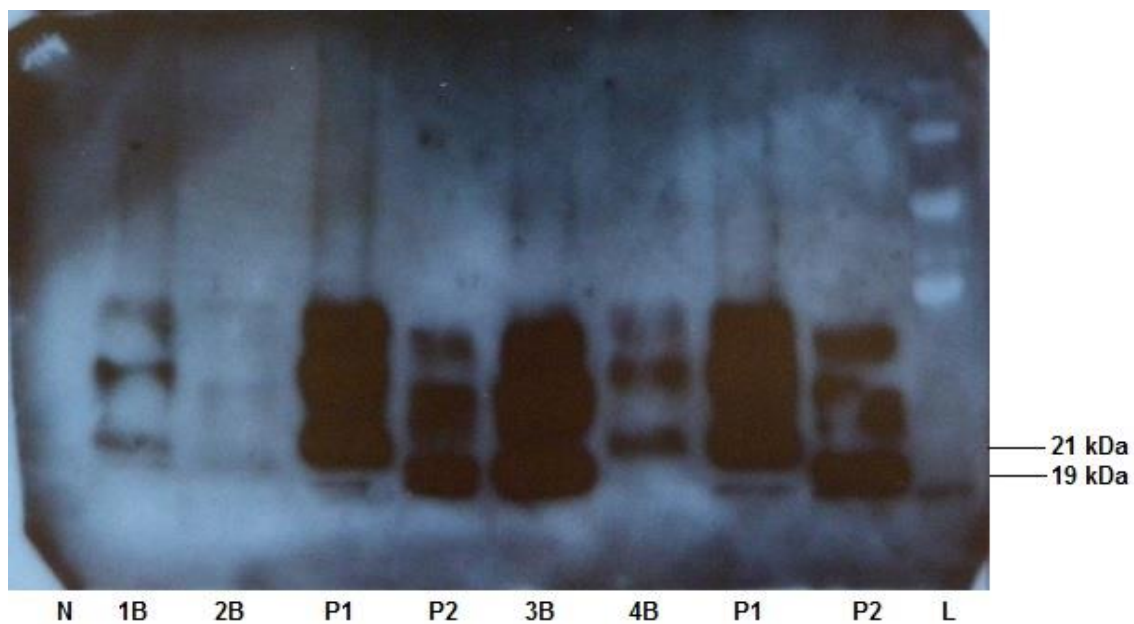
P1 pozitivní kontrola 1

P2 pozitivní kontrola 2

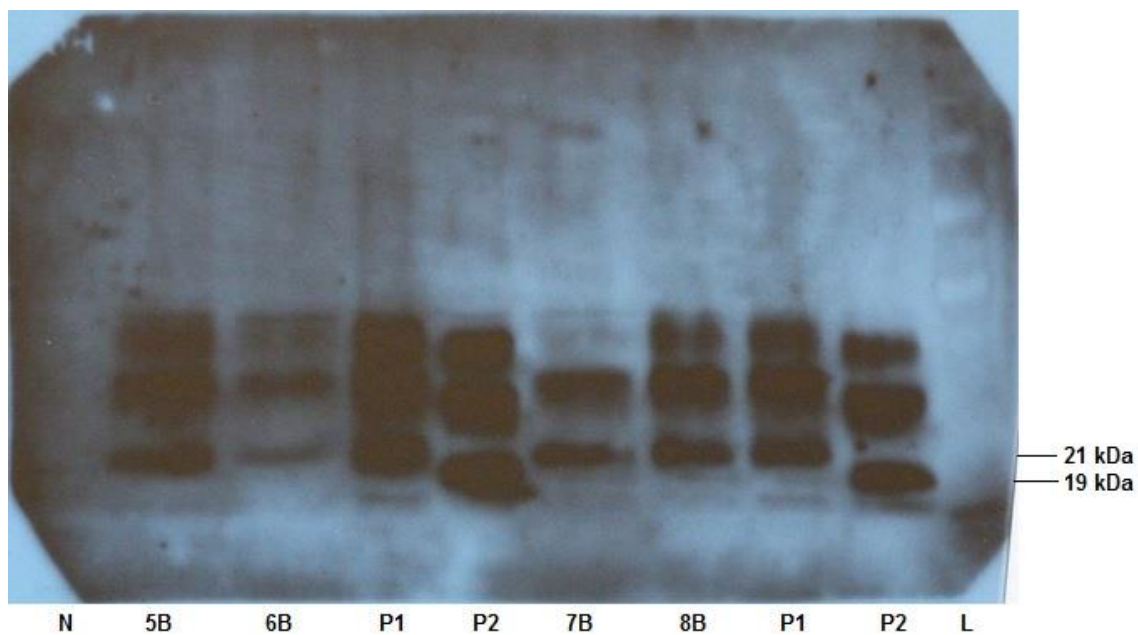
N negativní kontrola

Obrázek 13: Vyšetření prionů – detekce protilátkou 6H4

a) Expozice 30 s, vzorky značené 1B – 4B



b) Expozice 1. min, vzorky značené 5B – 8B



Vysvětlivky: 1 – 8 vzorky

B *post mortem*

L marker molekulových hmotností „ladder“

P1 pozitivní kontrola 1

P2 pozitivní kontrola 2

N negativní kontrola

V tabulce 3 jsou shrnuty výše uvedené výsledky vyšetření.

Tabulka 3: Vyšetření přítomnosti β – podjednotky 14-3-3 proteinu a prionového proteinu

vzorky	protein 14-3-3 β	12F10	6H4
1A 17. 10. 2013	+/-	N/A	N/A
1B 4. 11. 2013	+	+	+
2A 9. 10. 2014	+/-	N/A	N/A
2B 16. 2. 2015	+	-	+/-
3A 26. 9. 2012	-	N/A	N/A
3B 6. 6. 2014	+	+	+
4A 5. 6. 2015	+	N/A	N/A
4B 30. 6. 2015	+	+	+
5A 16. 1. 2013	+	N/A	N/A
5B 23. 1. 2013	+	+	+
6A 11. 12. 2013	+/-	N/A	N/A
6B 27. 12. 2013	+	+	+
7A 19. 6. 2014	-	N/A	N/A
7B 25. 8. 2015	+/-	+	+
8A 7. 8. 2014	+/-	N/A	N/A
8B 2. 9. 2014	+	+	+

Vysvětlivky: A	<i>ante mortem</i>
B	<i>post mortem</i>
Datum A	datum přijetí materiálu od živého pacienta
Datum B	datum pitvy pacienta
+	pozitivní
-	negativní
+/-	slabě pozitivní
N/A	nedostupná data

8.3 Stanovení koncentrace β -amyloidu

β -amyloid jsme vyšetřovali pomocí metody ELISA z osmi vzorků mozkomíšního moku odebraných jak *ante mortem*, tak *post mortem*. Všechny vzorky byly analyzované v duplikátu. Níže uvedená tabulka 4 odpovídá přesnému pořadí nanesených reagensů pro vzorky β -amyloid, h-TAU, p-TAU.

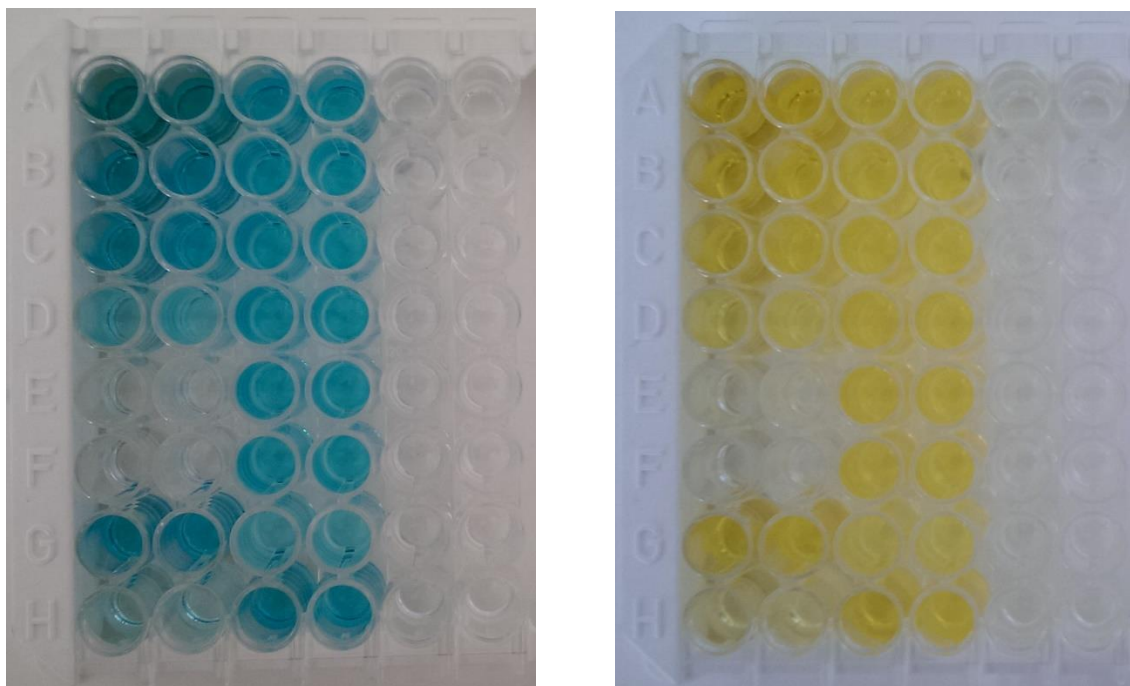
Tabulka 4: Pořadí nanášení jednotlivých vzorků

	1	2	3	4	5	6
A	K1	K1	1A	1A	1B	1B
B	K2	K2	2A	2A	2B	2B
C	K3	K3	3A	3A	3B	3B
D	K4	K4	4A	4A	4B	4B
E	K5	K5	5A	5A	5B	5B
F	K6	K6	6A	6A	6B	6B
G	RVC1	RVC1	7A	7A	7B	7B
H	RVC2	RVC2	8A	8A	8B	8B

Vysvětlivky: K1-K6	kalibrátory
RVC1-2	validační kontroly
A	<i>ante mortem</i>
B	<i>post mortem</i>

Na obrázku 14 lze vidět modré zbarvení jamek, které nastalo po inkubaci se substrátem TMB. Pro zastavení reakce jsme použili STOP roztok, který obsahuje kyselinu sírovou. Došlo k barevné změně z modré barvy na žlutou. Pro nezbarvené vzorky 1B – 8B, odebraných *post mortem*, nebylo možné absorpenci změřit.

Obrázek 14: Před a po přidání STOP roztoku pro stanovení β -amyloidu



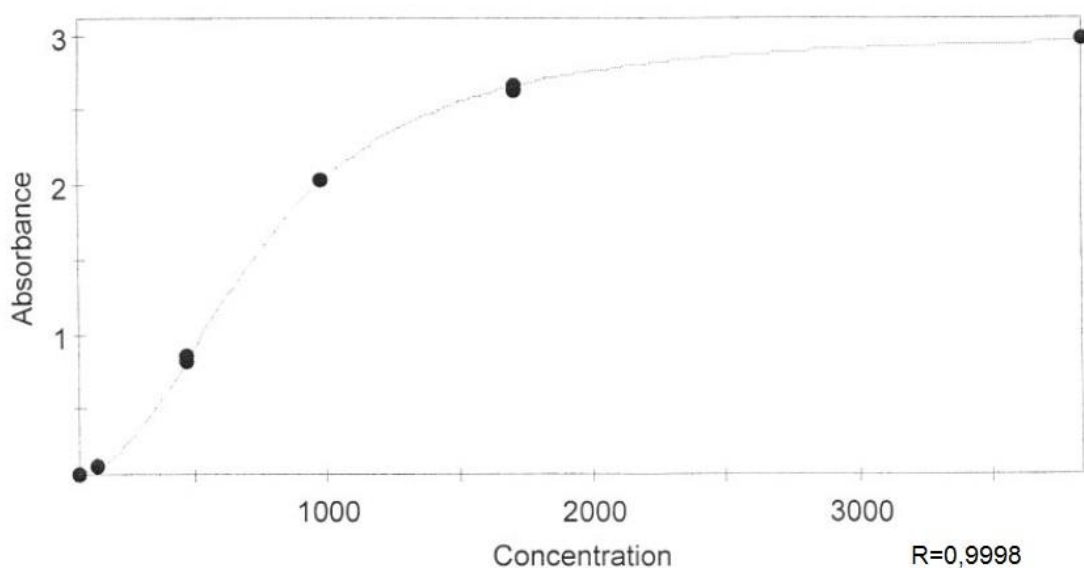
V následující tabulce 5 jsou zaznamenány body kalibrační křivky. Koncentrace jednotlivých kalibrátorů jsou připravené od výrobce a liší dle šarží.

Tabulka 5: Koncentrace kalibrátorů β -amyloidu

Kontrola	K1	K2	K3	K4	K5	K6
Koncentrace (pg/ml)	3835,6	1700,7	980,1	477,4	127,8	62,5

Z naměřených hodnot absorpencí bodů kalibrační křivky byla definována kalibrační křivka a z ní jsme pak stanovili koncentraci β -amyloidu v osmi vzorcích.

Graf 3: Kalibrační křivka β -amyloidu



Změřené hodnoty vzorků odebraných jak *ante mortem*, tak *post mortem* jsou uvedeny v tabulce 6 (viz níže). U všech vzorků odebraných *post mortem* byla naměřená koncentrace nižší, než je nejnižší bod kalibrační křivky. Vzorky č. 1 – 8 odebrané *ante mortem* se nacházejí v referenčním rozmezí (viz tabulka 7), vyjma vzorku č. 7, který má lehce sníženou hodnotu.

Tabulka 6: Změřené koncentrace vzorků č. 1 – 8 pro β -amyloid

Vzorky	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Koncentrace (pg/ml)	920,6	<62,5	992,8	<62,5	926,5	<62,5	874,8	<62,5
Vzorky	5A	5B	6A	6B	7A	7B	8A	8B
Koncentrace (pg/ml)	862,7	<62,5	817,3	<62,5	511,4	<62,5	937,1	<62,5

Vysvětlivky: A *ante mortem*
 B *post mortem*

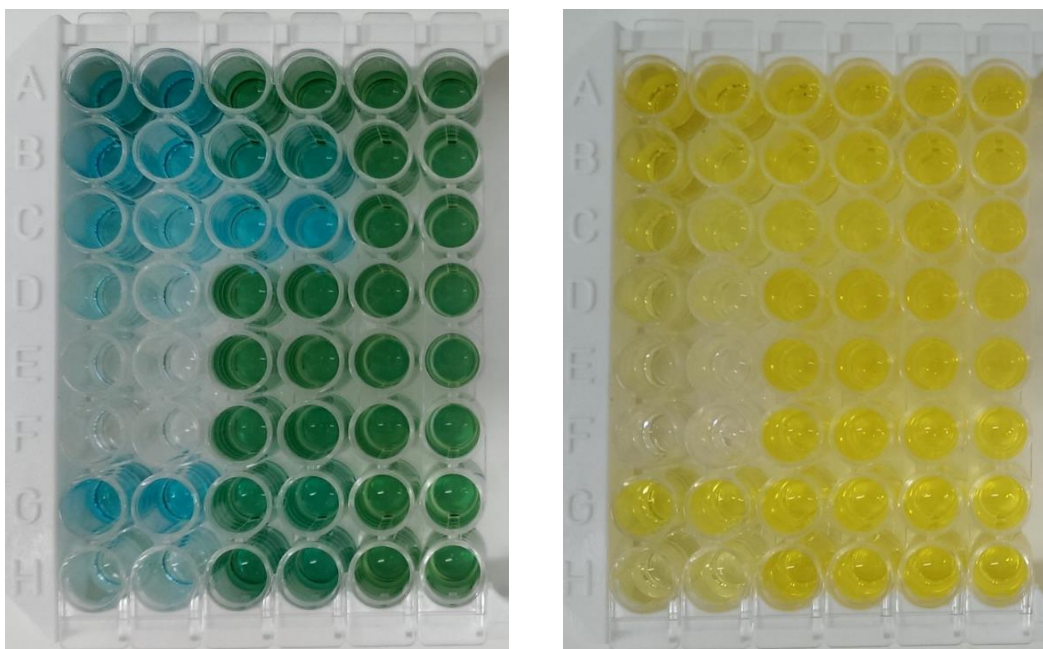
Tabulka 7: Referenční rozmezí hodnot β -amyloidu

Věk	CSF (pg/ml)
21 – 51	610 – 974
51 – 70	562 – 1018
≥ 71	567 – 1027

8.4 Stanovení koncentrace h-TAU

Na níže uvedeném obrázku 15 je možno vidět modré zbarvení kalibrátorů, validační kontroly a zelené zbarvení téměř vzorků po inkubaci substrátu TMB. Pro zastavení reakce jsme použili STOP roztok, který obsahuje kyselinu sírovou. Došlo k barevné změně z modré/zelené barvy na žlutou. Vzorky č. 1 – 8 vykazují neměřitelné hodnoty, z důvodu velmi vysoké koncentrace měřeného analytu, to však neplatí u vzorku č. 3A.

Obrázek 15: Před a po přidání STOP roztoku pro stanovení h-TAU proteinu



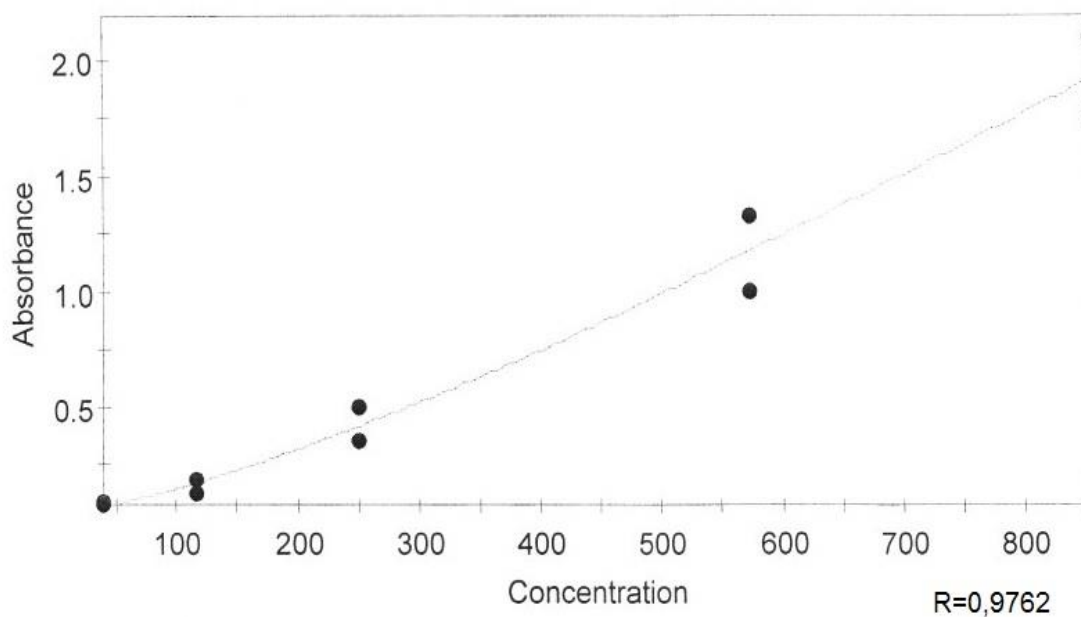
V následující tabulce 8 jsou zaznamenány body kalibrační křivky. Koncentrace jednotlivých kalibrátorů jsou připravené od výrobce a liší dle šarží.

Tabulka 8: Koncentrace kalibrátorů h-TAU

Kontrola	K1	K2	K3	K4	K5	K6
Koncentrace (pg/ml)	2268,9	853,9	573	250	116,3	38,8

Z naměřených hodnot absorbancí bodů kalibrační křivky byla definována kalibrační křivka (graf 4, viz níže) a z ní jsme pak stanovili koncentraci h-TAU v osmi vzorcích. Vysoké hodnoty koncentrace vzorků jsou vyšší než nejvyšší bod kalibrační křivky, tedy 2268,9 pg/ml.

Graf 4: Kalibrační křivka h-TAU



Tabulka 9 uvádí změřené koncentrace u vzorků odebraných *ante mortem* a *post mortem*. Všechny tyto hodnoty jsou vyšší než nejvyšší bod kalibrační křivky, vyjma vzorku č. 3A.

Tabulka 9: Změřené koncentrace vzorků č. 1 – 8 pro h-TAU

Vzorky	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Koncentrace (pg/ml)	>2268,9		>2268,9		853,3	>2268,9	>2268,9	
Vzorky	5A	5B	6A	6B	7A	7B	8A	8B
Koncentrace (pg/ml)	>2268,9		>2268,9		>2268,9		>2268,9	

Vysvětlivky: A *ante mortem*
 B *post mortem*

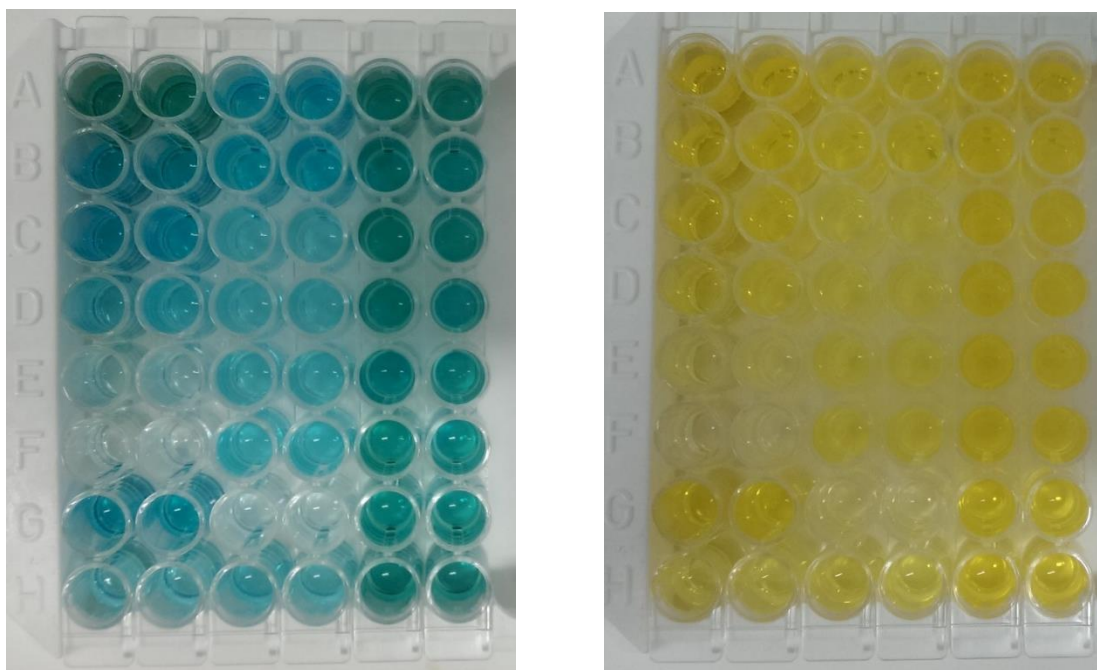
Tabulka 10: Referenční rozmezí hodnot h-TAU

Věk	CSF (pg/ml)
21 – 51	47 – 225
51 – 70	116 – 370
≥71	170 – 512

8.5 Stanovení koncentrace p-TAU

Na obrázku 16 (viz níže) je možno vidět modré zbarvení kalibrátorů a vzorků, po inkubaci substrátu TMB. Pro zastavení reakce jsme použili STOP roztok, který obsahuje kyselinu sírovou. Došlo k barevné změně z modré barvy na žlutou. Tmavé zbarvení vzorků č. 1B – 8B ukazují na vysoké koncentrace p-TAU.

Obrázek 16: Před a po přidání STOP roztoku pro stanovení p-TAU proteinu



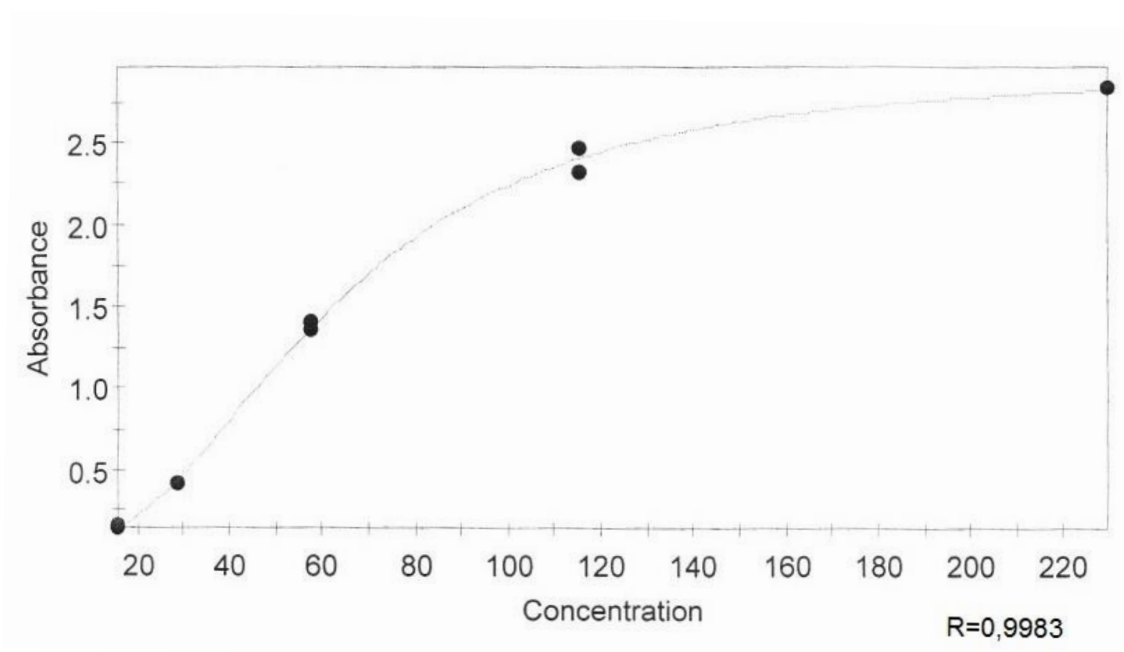
V následující tabulce 11 jsou zaznamenány body kalibrační křivky připravených od výrobce. Koncentrace kalibrátorů se liší dle šarží.

Tabulka 11: Koncentrace kalibrátorů p-TAU

Kontrola	K1	K2	K3	K4	K5	K6
Koncentrace (pg/ml)	967	229,4	115,6	57,6	28,8	15,6

Z naměřených hodnot absorbancí bodů kalibrační křivky byla definována kalibrační křivka a z ní jsme pak stanovili koncentraci p-TAU proteinu v osmi vzorcích.

Graf 5: Kalibrační křivka p-TAU



Koncentrace všech vzorků odebraných *post mortem* byly vyšší než nejvyšší bod kalibrační křivky. Koncentrace vzorků odebraných *ante mortem* se nachází ve fyziologickém rozmezí, kromě vzorků č. 1A a 2A, u nichž je koncentrace vyšší.

Tabulka 12: Změřené koncentrace vzorků č. 1 – 8 pro p-TAU

Vzorky	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Koncentrace (pg/ml)	90,1	>967	92,6	>967	43,2	>967	46,5	>967
Vzorky	5A	5B	6A	6B	7A	7B	8A	8B
Koncentrace (pg/ml)	49,8	>967	57	>967	21,1	>967	45,9	>967

Vysvětlivky: A *ante mortem*
 B *post mortem*

Tabulka 13: Referenční rozmezí hodnot p-TAU

Věk	CSF (pg/ml)
18 – 44	20 – 46
≥45	36 – 66

9 DISKUZE

Naším cílem bylo zhodnotit výsledky vyšetření mozkomíšního moku u osmi jedinců s podezřením na prionové onemocnění typu Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci. Rozdíly mezi naměřenými hodnotami mohou nastat nevhodnou dobou odběru vzorků (ENGELBORGHS & AL., 2008). Jako vhodnější možnost pro diagnostiku *ante mortem* je uvažována detekce PrP^{Sc} v krvi, což by bylo pro pacienta také vhodnější a bezpečnější. Zatím však žádná metoda dostatečné neodpovídala specifitě a senzitivitě (SMĚTÁKOVÁ, 2015). Pro stanovení PrP^{Sc} tak zůstává zlatým standardem vyšetření mozkové tkáně odebrané *post mortem*. Mozkovou tkáň lze odebrat i biopsií, ale jen v případě jasné diferenciální diagnostiky lymfomu, encefalitidy i vaskulitidy. V případě prionového onemocnění by mohlo dojít k iatrogennímu přenosu (RUSINA & MATĚJ, 2014).

Při podezření na prionové onemocnění se u zemřelých pacientů stanovuje přítomnost patogenní formy prionového proteinu. Původní velikost PrP^{Sc} 33 – 35 kDa je proteinázou K redukována na velikost 27 – 30 kDa. Tento zbývající fragment, označovaný jako PrP²⁷⁻³⁰, je k působení proteinázy K rezistentní. Pokud proteinázou K ošetříme vzorek obsahující PrP^C, dojde zcela k degradaci této molekuly. Právě tohoto rozdílného působení proteinázy se využívá ke stanovení přítomnosti PrP^{Sc} (PRIONICS, 2015).

Všech osm vzorků vykazuje na rentgenových snímcích (viz obr. 12, 13) pozitivitu, až na vzorek č. 2B. Při detekci protilátky 12F10 u vzorku č. 2B je výsledek negativní a při detekci protilátkou 6H4 slabě pozitivní. U všech osmi vzorků se prokázalo, že úmrtí pacientů způsobila sporadická forma Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci, která se také vyskytuje nejčastěji. Pro potvrzení CJN stačí jen slabá pozitivita, jak je tomu u vzorku č. 2B.

Existuje stále více důkazů, že biomarkery jsou při stanovení neurodegenerativních onemocnění velmi užitečné i přesto, že je za zlatý standard stále považována patologická diagnóza (ENGELBORGHS & AL., 2008).

V současné době je dle vyšetřovacích postupů WHO (viz tab. 2) za standardní diagnostiku při podezření na sCJN považováno testování přítomnosti β – podjednotky 14-3-3 proteinu v mozkomíšním moku. Tento nespecifický

marker se prokazuje u neurologického onemocnění způsobeného rychlou destrukcí nervové tkáně. Udává poměrně vysokou specifitu a senzitivitu (kolem 93 %), která je významně ovlivněna technikou odběru a indikací vyšetření. Proto má stanovení tohoto markeru praktický význam pouze u rychle progredující demence s neurologickými příznaky a také k potvrzení podezření na CJN (SCHMITZ & AL., 2016; MATĚJ & KOL., 2008).

Provedli jsme stanovení přítomnosti β – podjednotky 14-3-3 proteinu u osmi vzorků mozkomíšního moku odebraných jak *ante mortem*, tak *post mortem*. U všech osmi jedinců bylo prokázáno úmrtí na Creutzfeldtovu-Jakobovu nemoc. Vzorky č. 4 a 5 vykazují silnou pozitivitu proteinu 14-3-3 již při vyšetření mozkomíšního moku odebraného *ante mortem*. Oba tito pacienti zemřeli pár dní po odběru moku na toto vyšetření. Velký význam vyšetření lze u těchto pacientů přikládat rychlé masivní destrukci neuronů v CNS (RUSINA & MATĚJ, 2014). Výsledky vzorků č. 3 a 7 odebraných *ante mortem* jsou negativní. U těchto vzorků byl však pozitivní výsledek prokázán po úmrtí, které nastalo po více než jednom roce od odběru moku. Výsledek mohl být ovlivněn špatně načasovaným odběrem, protože se přítomnost proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku v průběhu onemocnění mění (MATĚJ & KOL., 2008). Slabou pozitivitu vykazují zbylé vzorky č. 1, 2, 6 a 8 odebrané *ante mortem*. U těchto případů byla doba úmrtí v období od 14 dnů po 4 měsíce po odběru (viz tab. 3).

Rozdílné výsledky těchto vzorků odebraných *ante mortem* mohou být však také ovlivněny dlouhou dobou skladování po odběru. Dále bylo potvrzeno, že vzorky mohou být při nevhodném odběru vzorků lumbální punkcí kontaminovány krví a ovlivnit výsledek na falešně pozitivní (HYEON & AL., 2015). Hladina proteinu 14-3-3 je také závislá na délce a pokročilosti onemocnění (VALIŠ, 2008b). Jelikož se protein 14-3-3 stanovuje pouze kvalitativně, je neustále snaha tyto aspekty zlepšit. Jako potenciální diagnostická metoda byla navržena ELISA. Pro diagnostiku CJN však ještě není v laboratořích široce používaná (HYEON & AL., 2015). Proto je důležité doplnit vyšetření proteinu 14-3-3 vyšetřením likvorového tripletu.

Při podezření na CJN je u pacientů důležité provést také stanovení likvorového tripletu (β -amyloid, h-TAU, p-TAU). Toto stanovení sice není součástí diagnostických kritérií, ale mají mnohem lepší přesnost než stanovení proteinu 14-3-3 (RUSINA & MATĚJ, 2014).

Imunologickou metodou ELISA jsme u jediného vzorku β -amyloidu odebraného *ante mortem* naměřili hodnotu, která byla lehce snížená pod fyziologické rozmezí. Toto lze vysvětlit ukládáním β -amyloidu do senilních plaků v mozku, v likvoru se pak protein vyskytuje v malém množství nebo vůbec (RUSINA & MATĚJ, Neurodegenerativní onemocnění, 2014). Ostatní naměřené hodnoty z mozkomíšního moku odebraného *ante mortem* se pohybovaly v rozmezí fyziologických hodnot, což odpovídá průkazu Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci, kdy koncentrace β -amyloidu nabývají normálních až mírně snížených hodnot (RUSINA & MATĚJ, 2014). Ve vzorcích, které byly odebrány *post mortem*, nebyl β -amyloid vůbec detekovatelný, což koresponduje s výše uvedenou tvorbou senilních plaků.

Stanovení celkového h-TAU proteinu jsme provedli u všech vzorků odebraných *ante mortem* a *post mortem* metodou ELISA. Téměř všechny koncentrace celkového h-TAU proteinu u vzorků č. 1 – 8 odebraných *ante mortem* a *post mortem* byly, vyjma vzorku č. 3 odebraného *ante mortem*, vyšší než nejvyšší bod kalibrační křivky, přesnou koncentraci tak nebylo možné stanovit. Jedinou měřitelnou hodnotou byl vzorek č. 3 odebraný *ante mortem*, hodnota však stále přesahovala hladiny referenčního rozmezí. Přítomnost celkového TAU proteinu v likvoru je pravděpodobně spojena s mírou neuronálního poškození a degenerací (KOUDELKOVÁ, 2009). Lze soudit, že množství TAU proteinu uvolněné do likvoru je závislé na rychlosti progresu onemocnění při poškození až zániku neuronů. CJD je spojována s vysokými hladinami TAU proteinu, které jsou výrazně specifické pro toto kvantitativní stanovení (VALIŠ, 2008b). Hladina TAU proteinu je také závislá na délce a pokročilosti onemocnění (VALIŠ, 2008b), což koresponduje i s našimi naměřenými hodnotami.

Vyšetření p-TAU proteinu jsme prováděli stejným způsobem jako předešlá stanovení β -amyloidu a h-TAU proteinu u vzorků likvoru *ante mortem* a *post mortem* metodou ELISA. Při vyšetření koncentrace p-TAU proteinu byly vzorky odebrané *ante mortem* v rozmezí kalibrační křivky, avšak vzorky odebrané *post mortem* byly opět neměřitelné. Hodnoty výsledné koncentrace zde byly vyšší než nejvyšší bod kalibrační křivky. Výsledné koncentrace u vzorků č. 1 a č. 2 odebraných *ante mortem* byly hodnoty měřitelné, avšak stále vyšší než fyziologická hodnota. Zvýšené hodnoty tohoto proteinu mohou být způsobené fosforylací TAU proteinu anebo uvolněním p-TAU proteinu do mozkomíšního moku

(BUERGER & AL., 2006), protože p-TAU je hlavní složkou neurofibrilárních klubek a jejich počet koreluje s koncentrací v likvoru (RUSINA & MATĚJ, 2014). U vzorku č. 7 *ante mortem* jsme naopak naměřili koncentraci nižší, než je fyziologické rozmezí. Ostatní vzorky měly koncentraci ve fyziologickém rozmezí hodnot. Při potvrzení Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci bývá hladina koncentrace p-TAU proteinu v normě, nebo mírně zvýšená (RUSINA & MATĚJ, 2014). Výsledky námi naměřené *ante mortem* tedy odpovídají hodnotám uvedeným v uvedené literatuře.

Naše výsledky potvrzují, že všichni vyšetřovaní jedinci zemřeli na neurodegenerativní onemocnění typu Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci. Dále bylo z našich výsledků patrné, že zakomponování vyšetření likvorového tripletu zpřesňuje diagnostiku Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci (HORT & KOL., 2007). Stanovení jednotlivých markerů by nemělo pro diagnostiku CJN takový význam jako jejich kombinace. Tento likvorový triplet je důležitý nejen pro diagnostiku CJN, ale také pro vyloučení jiných demencí. Např. u Alzheimerovy nemoci se také vyskytuje vyšší hodnota celkového h-TAU a p-TAU proteinu, ale výrazně nízký β -amyloid. Ten se sníží až o 50 %, což je výrazným znakem pro rozeznání Alzheimerovy choroby od CJN (RUSINA & MATĚJ, 2014). Pozitivní výsledky h-TAU a 14-3-3 proteinu nemusejí poukazovat jen na neurodegenerativní onemocnění, ale i na virové encefalopatie, cévní mozkové příhody, jiné onemocnění podobající se příznaky CJN (VAN EVERBROECK & AL., 1999). Uzavření definitivní diagnózy CJN lze pouze kombinací metod a vyšetření (ROHAN & KOL., 2015). Je velmi důležité správně identifikovat léčitelné nemoci od CJN, které má bohužel infaustní vyústění a průběh nemoci terapeuticky zcela neovlivnitelný.

10 ZÁVĚR

Vyšetřením likvoru a nativní mozkové tkáně u všech podezřelých jedinců jsme potvrdili přítomnost sporadické formy Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci. Výsledky ukazují, že likvorový triplet (h-TAU, p-TAU a β -amyloid) provedený metodou ELISA je stejně významný a možná i přesnější, než přítomnost β -podjednotky 14-3-3 proteinu, jejíž vyšetření je součástí kritérií diferenciální diagnostiky. Kombinace těchto markerů zlepšuje a zpřesňuje diferenciální diagnostiku CJN, ale také významně rozlišuje ostatní neurodegenerativní onemocnění, a to především Alzheimerovu nemoc a demenci s Lewyho tělísky. U proteinu 14-3-3 je stanovení pouze kvalitativní, proto je neustále snaha o zlepšení diagnostiky. Dosud nebyla vyvinuta žádná metoda pro přímé stanovení PrP^{Sc} *ante mortem*. Právě proto se používá vyšetření výše zmíněných markerů. Pro definitivní potvrzení diagnózy však stále zůstává zlatým standardem stanovení přítomnosti prionového proteinu v mozkové tkáni odebrané *post mortem*.

U některých literárních zdrojů může docházet k rozporům ohledně hraničních koncentrací likvorového tripletu. Proto je nutností, aby si každá laboratoř vytvořila vlastní normy. Sjednocení přesných referenčních hodnot je otázkou dalšího výzkumu.

Při podezření na prionové onemocnění je v České republice povinná autoptická verifikace. Proto má zásadní význam správné rozpoznání prionového onemocnění u pacienta, stejně tak jako u jeho rodiny, především u prokázaného dědičného onemocnění. V současné době neexistuje žádná účinná léčba Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci. Proto je vhodné zahájit včasnou paliativní péči a ušetřit pacienta dalších zbytečných vyšetření.

11 POUŽITÉ ZKRATKY

AMK	aminokyselina
APS	amonium persulfát
A β -40	beta amyloid 40
A β -42	beta amyloid 42
BSA	bovinní sérový albumin
BSE	bovinní spongiformní encefalopatie
CJN	Creutzfeldtova-Jakobova nemoc
CNS	centrální nervový systém
CSF	mozkomíšní mok
ČR	Česká republika
DWI	difuzní vážené zobrazení
ECL	chemiluminiscenční substrát
EEG	elektroencefalografie
ELFO	vertikální elektroforéza
ELISA	enzymová imunoanalýza
FFI	fatální familiární insomnie
GPI	glykofosfatidylinositol
GSS	Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinerův syndrom
h-TAU	celkový TAU protein
HRP	křenová peroxidáza
IKK	interní kontrola kvality
K	kontrola
MAP	protein spojený s mikrotubuly
MRI	magnetická rezonance
NK	negativní kontrola
p-TAU	fosforylovaný TAU protein
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PK	pozitivní kontrola
PrP	prionový protein
PrP ^C	prionový protein celulární
PrP ^{Res}	prionový protein rezistentní
PrP ^{Sc}	prionový protein scrapie

RVC	validační kontrola
SDS	dodecylsulfát sodný
TAU	TAU protein
T-PBS	promývací pufr s přidáním Tweenu
TEMED	N,N,N,N-tetramethylethylendiamin
TSE	transmisivní spongiformní encefalopatie
WB	Western blot
WHO	Světová zdravotnická organizace

12 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Diagnostická kritéria WHO pro vCJN.....	30
Tabulka 2: Diagnostická kritéria WHO pro sCJN a vCJN.....	31
Tabulka 3: Vyšetření přítomnosti β – podjednotky 14-3-3 proteinu a prionového proteinu.....	65
Tabulka 4: Pořadí nanášení jednotlivých vzorků.....	66
Tabulka 5: Koncentrace kalibrátorů β -amyloidu.....	67
Tabulka 6: Změřené koncentrace vzorků č. 1 – 8 pro β -amyloid.....	68
Tabulka 7: Referenční rozmezí hodnot β -amyloidu.....	69
Tabulka 8: Koncentrace kalibrátorů h-TAU.....	70
Tabulka 9: Změřené koncentrace vzorků č. 1 – 8 pro h-TAU.....	71
Tabulka 10: Referenční rozmezí hodnot h-TAU.....	71
Tabulka 11: Koncentrace kalibrátorů p-TAU.....	72
Tabulka 12: Změřené koncentrace vzorků č. 1 – 8 pro p-TAU.....	73
Tabulka 13: Referenční rozmezí hodnot p-TAU.....	74

13 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schématická struktura PrP ^C	14
Obrázek 2: Molekulární struktura PrP ^C a PrP ^{Sc}	15
Obrázek 3: Mechanismus přeměny fyziologického proteinu PrP ^C na infekční formu proteinu PrP ^{Sc}	16
Obrázek 4: Zastoupení tří glykosylovaných forem PrP ^{Sc} po působení enzymu proteinázy K	17
Obrázek 5: Schématické uspořádání polosuchého přenosového systému v horizontální poloze	41
Obrázek 6: Chemiluminiscenční reakce	43
Obrázek 7: Princip INNOTESTU β-amyloid (1-42)	45
Obrázek 8: Princip INNOTESTU h-TAU	46
Obrázek 9: Princip INNOTESTU p-TAU _(181p)	46
Obrázek 10: Vyšetření vzorků odebraných ante mortem	59
Obrázek 11: Vyšetření vzorků odebraných post mortem	61
Obrázek 12: Vyšetření prionů – detekce protilátkou 12F10	62
Obrázek 13: Vyšetření prionů – detekce protilátkou 6H4	64
Obrázek 14: Před a po přidání STOP roztoku pro stanovení β-amyloidu	67
Obrázek 15: Před a po přidání STOP roztoku pro stanovení h-TAU proteinu ..	69
Obrázek 16: Před a po přidání STOP roztoku pro stanovení p-TAU proteinu ..	72

14 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Definitivní počet úmrtí ve Velké Británii v období 2006 – 2016 (stav k 7. 3. 2016).....	24
Graf 2: Definitivní počet úmrtí v České republice v období 2006 – 2016 (stav k 17. 3. 2016).....	25
Graf 3: Kalibrační křivka β -amyloidu	68
Graf 4: Kalibrační křivka h-TAU.....	70
Graf 5: Kalibrační křivka p-TAU.....	73

15 POUŽITÁ LITERATURA

ACEVEDO-MORANTES, C. Y. & HOLGER, W. (2014). The structure of human prions: from biology to structural models-considerations and pitfalls. *Viruses*, 6 (10): 3875-3892.

AGHAZADEH, Y. & PAPADOPOULOS, V. (2016). The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug. *Drug Discovery Today*, 21 (2): 278-287.

AGUZZI, A. & AL. (2001). Prions: Health scare and biological challenge. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2 (2): 118-126.

AGUZZI, A. & CALLELA, A. M. (2009). Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev*, 89 (4): 1105-1152.

BÁRTA, J. & KOL. (2010). Analýza proteinů pomocí automatické čipové elektroforózy experion a porovnání s metodou SDS-PAGE. *Chemické listy*, 104 (1): 33-40.

BARTOŠ, A. & KOL. (2012). Likvorový triplet (tau proteiny a beta-amyloid) v diagnostice Alzheimerovy-Fischerovy nemoci. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 75/108 (5): 587-594.

BIO-RAD. (2016). *Introduction polyacrylamide gels*. Citováno [2016-03-18]. Dostupné na: <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/introduction-polyacrylamide-gels>

BIO-RAD. (2016). *Protein blotting methods*. Citováno [2016-06-26]. Dostupné na: <http://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/protein-blotting-methods>

BROWN, P. & AL. (2012). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerging infectious diseases*, 18 (6): 901-907.

BUERGER, K. & AL. (2006). Dissociation between CSF total tau and tau protein phosphorylated at threonine 231 in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiology of Aging*, 27 (1): 10-15.

EDINBURGH, T. U. (2016). *The national CJD research and surveillance unit*. Citováno [2016-03-07]. Dostupné na: <http://www.cjd.ed.ac.uk/documents/figs.pdf>

ENGELBORGHES, S. & AL. (2008). Diagnostic performance of a CSF-biomarker panel in autopsy-confirmed dementia. *In Neurobiology of Aging*, 29 (8): 1143-1159.

FERENČÍK, M. (1998). Stanley B. Prusiner - laureát Nobelovej ceny za medicínu v r. 1997. *Medicínsky monitor* (1): 8. ISSN: 1335-0951.

FIALOVÁ, L. & KOL. (2011). Stanovení tau proteinu v mozkomíšním moku pacientů s roztroušenou sklerózou dvěma soupravami ELISA. *Česká společnost klinické biochemie*, 19 (2): 113-118.

FRANKOVÁ, V. & KRAUSOVÁ, M. (2008). Lidské prionové nemoci. *Psychiatrie pro praxi*, 9 (3): 116-119.

FUJIREBIO. (2015). *INNOTEST® hTAU Ag*. Citováno [2016-06-16]. Dostupné na: <https://www.fujirebio-europe.com/products-services/product-browser/innotestr-htau-ag-2>

FUJIREBIO. (2015). *INNOTEST® PHOSPHO-TAU(181P)*. Citováno [2016-06-16]. Dostupné na: <https://www.fujirebio-europe.com/products-services/product-browser/innotestr-phospho-tau181p-1>

FUJIREBIO. (2015). *INNOTEST® β -AMYLOID(1-42)*. Citováno [2016-06-16]. Dostupné na: <https://www.fujirebio-europe.com/products-services/product-browser/innotestr-v-amyloid1-42>

GAN, D. & PATEL, K. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked. *Journal of Investigative Dermatology*, 133 (9): 1-3

GDOVINOVÁ, Z. (2013). Creutzfeldtova-Jakobova choroba. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 76/109 (2): 138-154.

GLIEROVÁ, H. & HOLADA, K. (2006). Úloha imunitního systému v prionových chorobách. *Alergie* (2): 143-148.

HANUSOVÁ, Z. & KOL. (2015). Prionový protein, jeho úloha v buněčné proliferaci, diferenciaci a vývoji nervové soustavy. *Česká a slovenská neurologická neurochirurgie*, 78/111 (4): 406-412.

HORT, J. & KOL. (2007). Tau protein a beta amyloid v likvoru. *Česká a slovenská neurologická neurochirurgie*, 70/103 (1): 30-36.

HOŘÍN, P. (2002). Genetika prionových onemocnění. *Živa* (2): 50-52.

HYEON, J. & AL. (2015). Alternative application of Tau protein in Creutzfeldt-Jakob disease diagnosis: Improvement for weakly positive 14-3-3 protein in the laboratory. *Scientific Reports*, (5): 1-9

JIRÁK, R. (2008). Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 9 (4): 240-244.

JOHNSON, G. & STOOHOFF, W. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal Of Cell Science*, 117 (24): 5721-5729.

KOLAROVA, M. & AL. (2012). Structure and pathology of Tau protein in Alzheimer disease. *International Journal of Alzheimer's disease*: 1-13

KOUDELKOVÁ, M. (2009). Praktické zkušenosti s laboratorní diagnostikou Alzheimerovy nemoci pomocí tau proteinu. *Neurologie pro praxi*, 10 (5): 290-293.

KOUKOLÍK, F. (2007). Lidská prionová onemocnění. *Praktický lékař*, 87 (10): 596-602.

KROMBHOLZ, R. (2015). Prionové demence. *Psychiatria pre prax*, 16 (1): 31-34.

LUKAN, A. & AL. (2013). TSE diagnostics: recent advances in immunoassaying prions. *Clinical and Developmental Immunology*: 1-8.

MAHMOOD, T. & YANG, P. (2012). Western blot: technique, theory and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4 (9): 429-434.

MANDELKOW, E. & MANDELKOW, M. (2012). Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold spring harbor perspectives in medicine*, 2 (7): 1-25.

MATĚJ, R. & KOL. (2008). Vyšetřování proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku – klinicko-patologická korelace. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 71/104 (6): 695-699.

MUCHY, M. & LEVINE, H. (2010). Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19 (1): 311-323.

PARCHI, P. & AL. (2012). Consensus classification of human prion disease histotypes allows reliable identification of molecular subtypes: an inter-rater study among surveillance centres in Europe and USA. *Acta Neuropathologica*, 124 (4): 517-529.

PERL, D. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 77 (1): 32-42.

PRIONICS. (2015). *Prionics®-Check WESTERN*. Citováno [2016-06-30]. Dostupné na: http://www.cultek.com/pdf/Prionics_Check-WB.pdf

PRUSINER, S. B. (1998). Prions. *The National Academy of Sciences*, 95 (23): 13363-13383

ROHAN, Z. & KOL. (2013). Lidské prionové nemoci v České republice – 10 let zkušeností s diagnostikou. *Česká a Slovenská neurologie a neurochirurgie*, 76/109 (3): 300-306.

ROHAN, Z. & KOL. (2015). Lidská prionová onemocnění v České republice. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, 64 (3): 115-120.

RUSINA, R. & KOL. (2010). Léčba pokročilé demence - paliativní přístup. *Neurologie pro praxi*, 11 (1): 16-19.

RUSINA, R. & MATĚJ, R. (2012). Prionová onemocnění. *Neurologie pro praxi*, 12 (2): 78-82.

RUSINA, R. & MATĚJ, R. (2014). *Neurodegenerativní onemocnění*. 1. vyd. Praha: Mladá fronta a.s.: 351. ISBN 978-80-204-3300-8.

SCIENCE, G. H. (2011). *GE Healthcare-Western blotting*. Citováno [2016-03-20]. Dostupné na: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/ge-western-blotting.pdf.

SCIENTIFIC, T. F. (2015). *Overview ELISA*. Citováno [2016-03-21]. Dostupné na: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>

SCHMITZ, M. & AL. (2016). Validation of 14-3-3 protein as a marker in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease diagnostic. *Molecular neurobiology*, 53 (4): 2189-2199.

SMĚTÁKOVÁ, M. (2015). Role imunitního systému u prionového onemocnění. *Atestační práce*. Národní referenční laboratoř pro prionové choroby v Thomayerově nemocnici v Praze: 40.

STORCHOVÁ, Z. (1998). Priony. *Vesmír*, 77 (1):15-19.

ŠŤASTKOVÁ, Z. & KOL. (2012). Možnosti detekce stafylokokových enterotoxinů. *Chemické listy*, 106 (8): 745-749.

THERMOFISHER. (2015a). *Overview western blotting*. Citováno [2016-06-15]. Dostupné na: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-western-blotting.html>

THERMOFISHER. (2015b). *Chemiluminescent western blotting*. Citováno [2016-06-15]. Dostupné na: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-western-blotting.html>

TRIARHOU, L. (2009). Alfons Maria Jakob (1884-1931), Neuropathologist par Excellence. *European Neurology*, 61 (1): 52-58.

UCSF. (2016). *University of California San Francisco*. Citováno [2016-02-26]. Dostupné na: https://ucsf.edu/sites/default/files/legacy_files/072902a.jpg

VALIŠ, M. (2008a). Diagnostické markery v mozkomíšním moku. *Doktorandská dizertační práce*. Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity v Brně: 78.

VALIŠ, M. (2008b). Tau-protein, fosforylovaný tau-protein a beta-amyloid 42 v likvoru u demencí a roztroušené sklerózy. *Česká a Slovenská neurologie a neurochirurgie*, 71/104 (3): 329-335.

VAN EVERBROECK, B. & AL. (1999). Decreased levels of amyloid- β 1-42 in cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, 1 (6): 419-424.

WHO. (2003). *WHO manual for surveillance of human transmissible spongiform encephalopathies including variant Creutzfeldt-Jakob disease*. Geneva: World Health Organization.: 105. ISBN 92-4-154588-7