

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd

**Vývoj MELISA metody pro stanovení autoprotilátek spojených
s Alzheimerovou chorobou**

Bc. Věra Vozandychová

Diplomová práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Věra Vozandychová**
Osobní číslo: **C15641**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Vývoj MELISA metody pro stanovení autoprotilátek spojených s Alzheimerovou chorobou**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

Z dostupné literatury připravit rešerši o uplatnění autoimunity při patofyziologii Alzheimerovy choroby, zaměřit se na výskyt autoprotilátek proti biomarkerům Alzheimerovy choroby, přednostně na autoprotilátky proti $A\beta$ -peptidům. Pro úplnost zpracovat přehled metod používaných k detekci a stanovení autoprotilátek.

Experimentální část:

Optimalizovat metodu MELISA pro monitorování titru, specifity a afinity protilátek proti biomarkerům Alzheimerovy choroby. Jako modelový systém použít chymotrypsin a jeho specifické protilátky a srovnat se standardní ELISA technikou. Aplikace optimálních podmínek na systém $A\beta$ -peptidů a jejich specifických protilátek s cílem kvantifikace anti- $A\beta$ autoprotilátek v patientských vzorcích (CSF, sérum).

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Původní zdroje z webových databází Web of Sciences, PubMed, ScienceDirect.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Pavla Krulišová**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

.....
Věra Vozandychová

Velké díky na tomto místě náleží především vedoucí práce Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. a konzultantce Mgr. Pavle Krulišové za odborné vedení a velkou pomoc při zpracovávání diplomové práce i při práci v laboratoři, cenné rady a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Jiřímu Palarčíkovi, Ph.D. za odborné analýzy pro tuto práci, a také Ing. Veronice Podzemné Ph.D. z pracoviště CEMNAT a projektům LM2015082 a CZ.1.05 / 4.1.00 / 11.0251 z Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR. Také děkuji Všem pracovníkům laboratoře za kolegiálnost a vstřícnost. V neposlední řadě patří obrovské poděkování mým nejbližším, kteří jsou mi oporou v mém vzdělávání.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá optimalizací metody ELISA na magnetických částicích pro stanovení autoprotilátek ze séra proti biomarkeru Alzheimerovy choroby, amyloidu β (1-42). Nejprve byl vybrán nejvhodnější nosič v modelovém systému s proteinem α -chymotrypsinem a částečně zoptimalizován postup jeho přípravy. V systému s imobilizovaným $A\beta$ (1-42) na magnetických částicích, byl vybrán nosič ještě modifikován raménkem a byla řešena jeho nejvhodnější blokace. Nakonec byl připravený nosič s imobilizovaným $A\beta$ (1-42) aplikován pro stanovení hladin anti- $A\beta$ (1-42) autoprotilátek v sérech pacientů.

KLIČOVÁ SLOVA

Alzheimerova choroba, amyloid beta, autoimunita, autoprotilátky, magnetické částice, ELISA metoda, MELISA metoda

TITLE

Development of MELISA method for the determination of autoantibodies associated with Alzheimer's disease

ANNOTATION

The thesis deals with optimization of magnetic beads ELISA method for determination of autoantibodies against biomarker of Alzheimer's disease, Amyloid β (1-42). First, the most appropriate carrier was selected in the model system with α -chymotrypsin, and the preparation proces partly optimized. In the system with immobilized $A\beta$ (1-42) on magnetic particles, the selected carrier was further modified by a shoulder and its was solved the most appropriate blocking. Finally, an immobilized $A\beta$ (1-42) carrier was prepared to determine the levels of anti- $A\beta$ (1-42) autoantibodies in patient's sera.

KEY WORDS

Alzheimer's disease, amyloid beta, autoimmunity, autoantibodies, magnetic beads, ELISA method, MELISA method

Obsah

Úvod.....	10
1. Cíle diplomové práce	11
2. Teoretická část.....	12
2.1. Patofyziologie Alzheimerovy choroby.....	12
2.2. Biomarkery ACH.....	14
Krevní biomarkery	15
2.2.1. Beta-amyloid jako hlavní biomarker ACH	15
2.2.2. Tau protein a jeho úloha v patofyziologii ACH.....	18
2.2.3. Klusterin a jeho úloha při ACH.....	20
2.2.4. Nové biomarkery v CSF.....	20
2.3. Autoimunitní procesy u ACH.....	21
2.3.1. Imunoglobuliny	21
2.3.2. Pojem autoimunita.....	22
2.3.3. Autoimunita u ACH	24
2.3.4. Disfunkce hematoencefalické bariéry	26
2.3.5. Výskyt autoprotilátek při ACH	27
Protilátky proti beta-amyloidu	28
Protilátky proti fosforylovanému tau proteinu	29
Protilátky proti oxidovaným lipoproteinům s nízkou hustotou.....	30
Protilátky proti gangliosidu GM1	30
Protilátky proti neurotransmiterům	31
Protilátky proti proteinu S100B	31
Protilátky proti aldoláze	32
Protilátky proti rabaptinu	32
Autoprotilátky proti receptoru pro produkty pokročilé glykace	33
Protilátky proti ATP-syntáze.....	33

Redox-reaktivní protilátky	34
2.4. Metody využívané pro stanovení specifických autoprotilátek u Alzheimerovy choroby.....	35
Možné komplikace při stanovení autoprotilátek	35
2.4.1. Enzymová imunoanalýza na pevné fázi – ELISA.....	36
2.4.2. Nové metody pro stanovení autoprotilátek	38
Enzymová imunoanalýza s využitím magnetických částic – MELISA	38
Western blotová metoda s imunochemickou detekcí.....	42
Mikrofluidní technologie.....	43
Multiplexní analýza autoprotilátek.....	45
3. Experimentální část.....	46
3.1. Přístroje a pomůcky	46
3.2. Charakterizace a příprava magnetického nosiče	47
3.2.1. Charakteristika vybraných magnetických částic	47
3.2.2. Charakterizace magnetických částic pomocí skenovací elektronové mikroskopie.....	47
3.2.3. Charakterizace magnetických částic pomocí dynamického rozptylu světla	48
3.2.4. Měření zeta-potenciálu u magnetických částic	48
3.2.5. Imobilizace α -chymotrypsinu na magnetický nosič.....	49
3.2.6. Imobilizace $A\beta$ na magnetický nosič	50
3.2.7. Stanovení aktivity imobilizovaného α -chymotrypsinu	52
3.2.8. Stanovení množství proteinu pomocí BCA testu	54
3.2.9. Tricin-SDS-PAGE elektroforéza.....	56
3.2.10. Vizualizace proteinů/peptidů v PAGE pomocí dusičnanu stříbrného	57
3.2.11. Enzymová imunoanalýza s využitím magnetických částic	58
3.2.12. Enzymová imunoanalýza v mikrotitrační destičce – $A\beta$ systém.....	60
4. Výsledky a diskuze.....	62
4.1. Výběr magnetického nosiče pro metodu MELISA	62

4.2.	Charakterizace magnetických částic pomocí skenovací elektronové mikroskopie a dynamického rozptylu světla.....	63
4.3.	Příprava magnetického nosiče s α -chymotrypsinem	66
4.4.	Optimalizace metody ELISA s využitím magnetických částic	72
4.5.	Příprava magnetického nosiče s A β (1-42) peptidem.....	74
4.6.	Vývoj metody ELISA s využitím magnetických částic pro detekci A β protilátek ...	78
4.6.1.	Sledování skladovací stability magnetického nosiče metodou MELISA	81
4.7.	Stanovení hladiny autoprotilátek proti A β (1-42) v patientských sérech metodou MELISA	83
5.	Závěr.....	86
6.	Seznam zkratk	88
7.	Seznam použité literatury	91
8.	Seznam internetových zdrojů	113
9.	PŘÍLOHY.....	115
9.1.	Příloha A - SiMAG-Amine (Chemicell, Berlín, Německo, průměr: 1 μ m)	115
9.2.	Příloha B - SiMAG-Carboxyl (Chemicell, Berlín, Německo, průměr: 1 μ m)	116
9.3.	Příloha C - ProMAG-Carboxyl (Bangs Laboratories, Indiana, USA, průměr: 0,8 μ m).....	116
9.4.	Příloha D - Dynabeads M-270 Amine (Invitrogen Dynal, Carlsbad, CA, USA, průměr: 2,8 μ m).....	117
9.5.	Příloha E - Micromer-M NH ₂ (Micromod, Rostock, Německo, průměr: 3 μ m)	118

Úvod

Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou demence u lidí po 65. roce života po celém světě, kdy tato choroba zastupuje až 80 % všech případů demence [1, 2]. Dnes se odhaduje kolem 5 miliónů nemocných Alzheimerovou chorobou ve Spojených státech a na celém světě až 34 miliónů. Počet nemocných rapidně stoupá a statistiky předpovídají, že se v roce 2050 dokonce ztrojnásobí [3-5]. Předpokládaný dramatický nárůst nemocných jedinců v příštích desetiletích vyžaduje vývoj diagnostických testů identifikujících biomarkery tohoto onemocnění. Obzvláště žádoucí je využití specifických krevních biomarkerů [6].

Jedním takovým specifickým biomarkerem by mohly být autoprotilátky proti amyloidu β ($A\beta$) v sérech pacientů. Hladina těchto protilátek je zatím stále dost diskutována. Některé studie uvádějí vyšší hladiny těchto protilátek u zdravých pacientů, v jiných naopak nižší hladiny anti- $A\beta$ protilátek. V některých studiích pro změnu nenašli žádné rozdíly v hladinách protilátek proti $A\beta$ mezi zdravými a nemocnými pacienty s Alzheimerovou chorobou.

Tato práce je zaměřena na vývoj metody ELISA s využitím magnetických částic (MELISA) pro stanovení autoprotilátek proti amyloidu β , konkrétně amyloidu β (1-42). Snahou bude připravit ten nejvhodnější nosič pro vazbu antigenu, tedy samotného amyloidu β (1-42), pro dosažení co nejcitlivějšího stanovení anti- $A\beta$ (1-42) autoprotilátek v patientských sérech. Komplikacemi způsobujícími zvýšení hodnot u slepých vzorků jsou interference proteinů ze séra, maskování protilátek nebo účinky polyvalentních protilátek. Pokud se všechny tyto komplikace dokáží co nejvíce snížit, bude tato metoda jistě kvalitním nástrojem pro včasnou diagnostiku a ukazatelem progresu Alzheimerovi choroby.

1. Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce je zpracovat rešerši o uplatnění autoimunity při patofyziologii Alzheimerovi choroby a vytvořit přehled metod k detekci a stanovení autoprotilátek. V experimentální části je pak cílem optimalizovat metodu MELISA pro stanovení autoprotilátek proti amyloidu β u Alzheimerovy choroby z patientských sér.

U enzymové imunoanalýzy na pevné fázi, metody ELISA, je antigen vázán na pevnou fázi, nejčastěji na stěnu jamky mikrotitrační destičky. Jako pevná fáze byly v této práci zvoleny magnetické částice. Magnetické částice jsou výhodné především z hlediska většího specifického povrchu pro vazbu ligandu, než jaký nabízí stěna jamky v mikrotitrační destičce. Proto se předpokládá i vyšší citlivost u MELISA metody, která je potřebná pro stanovení biomarkerů s nižší koncentrací v biologických materiálech. Použití metody ELISA, konkrétně s využitím magnetických částic, je záměrné především z důvodu širokého vývoje metod ELISA pro stanovení anti-A β autoprotilátek.

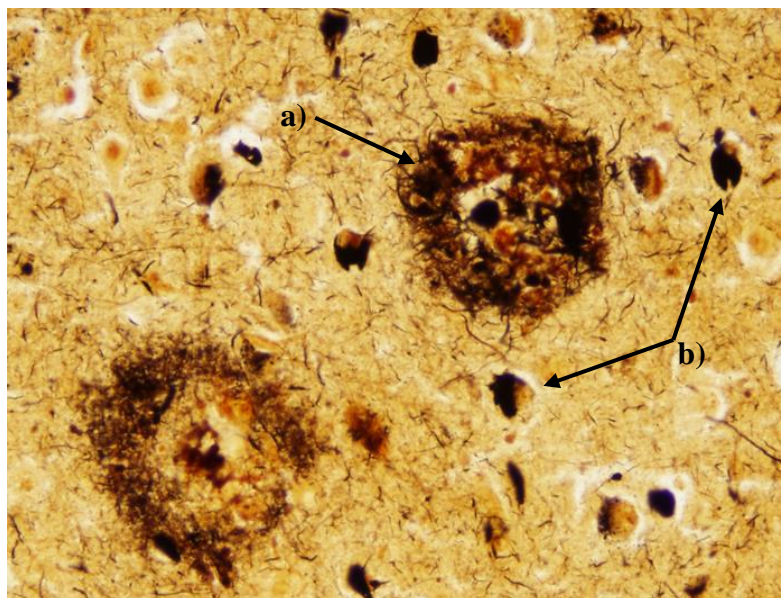
Prvním krokem tedy bude charakterizace s následným výběrem magnetických částic, použitých jako nosič pro antigen. V této práci je tímto antigenem biomarker ACH amyloid β (1-42). Ovšem charakterizace magnetických částic bude provedena v modelovém systému s α -chymotrypsinem. Na nosič bude imobilizován α -chymotrypsin, později A β (1-42), a dále bude modifikován vybraným vhodným blokačním činidlem pro eliminaci případných nespecifických interakcí ze séra. Připravený nosič s A β (1-42) pak bude použit pro stanovení anti-A β (1-42) autoprotilátek v sérech pacientů metodou MELISA.

2. Teoretická část

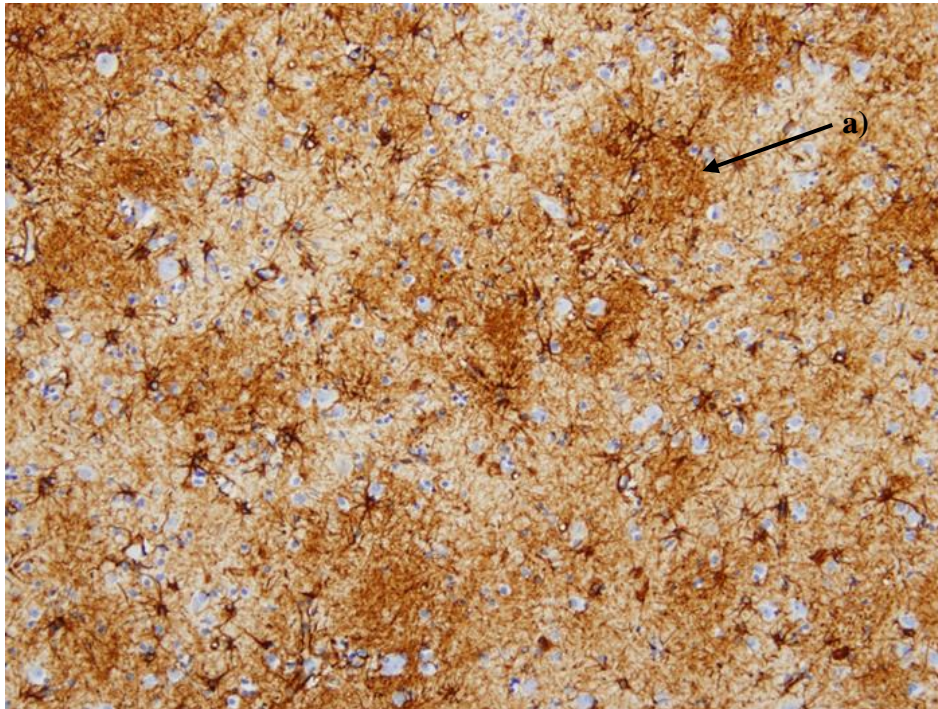
2.1. Patofyziologie Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba (ACH) patří k neurodegenerativním onemocněním, která se projevují heterogenními patologickými stavy, kdy se specifické oblasti centrálního nervového systému (CNS) postupně a relativně pomalu poškozují. To má za následek poruchy pohybových nebo kognitivních funkcí [7].

Alzheimerova choroba je progresivní degenerativní neurologické onemocnění. Nejdříve se projevuje ztrátou paměti, která se zhoršuje. Poté se přidávají další příznaky, jako je zmatenost, změna chování způsobená poklesem kognitivních funkcí CNS, a projev demence. Tyto projevy jsou způsobeny nezvratnou ztrátou neuronů, především v hipokampu a mozkové kůře, a snížením některých hladin neurotransmiterů, konkrétně acetylcholinu. Ztráta nervových buněk je provázena tvorbou neurofibrilárních klubek, nacházejících se uvnitř buněk, a amyloidních plaků, tvořících se v prostoru mezi nervovými buňkami (Obrázek 1) [1-3, 7]. Amyloidní plaky jsou obklopeny reaktivními astrocyty se zvýšenou expresí gliálního fibrilárního kyselého proteinu (GFAP). Tyto reaktivní astrocyty jsou součástí tzv. gliózy (Obrázek 2) [8, 9]. Glióza je zmnožení astrocytů při patologickém poškození mozku, kdy jsou nervové buňky nevratně poškozeny [249].



Obrázek 1 Senilní plaky (a) a neurofibrilární klubka (b). Bielschowskioho barvení stříbrem [250].



Obrázek 2 Glióza v amyloidních placích a jejich okolí (a). Imunohistochemické barvení pomocí protilátek proti GFAP [250].

Do rizikových faktorů této nemoci se řadí vyšší věk, rodinná anamnéza, nižší vzdělání a ženské pohlaví [7]. Obecně se tato choroba začíná projevovat u lidí ve věku nad 65 let, tzv. senilní forma, ale vzácně se objevuje i presenilní forma onemocnění. Ta je známá jako forma s časným začátkem, která se projevuje u pacientů již ve čtyřicátém roce života. Brzkým a hlavním příznakem ACH je epizodický deficit paměti, který se zhoršuje v průběhu preklinického období, a je doprovázen stále vážnějším narušením vyjadřování, pozornosti a exekutivních psychických funkcí v pozdějších fázích onemocnění [10-15]. Včasné stanovení diagnózy ACH je důležité pro brzkou léčebnou intervenci [16].

Podle diagnostických kritérií rozlišujeme několik fází ACH – jedná se o preklinickou fázi ACH, mírnou kognitivní poruchu (MCI) v důsledku ACH a pozdní fázi ACH. Mnoho jedinců s preklinickou fází má již vytvořené amyloidní plaky, přesto nemají klinické příznaky. Z tohoto důvodu je obtížné tuto fázi studovat [17-20].

MCI byla zařazena do kategorie přechodové fáze, mezi normálními kognitivními funkcemi a pozdní fází ACH. Tato MCI se dále rozděluje na amnestickou MCI (aMCI) a neamnestickou MCI (naMCI). Rozdíl mezi těmito dvěma skupinami je v patologické zátěži amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek. Hodnoty těchto rozdílů se odlišují. Ale ve výzkumu Vos a jeho kolegů byly přeci jen nalezeny rozdíly mezi oběma skupinami.

Pacienti s naMCI mají vyšší koncentraci amyloidu β (1-42) v mozkomíšním moku (CSF) a dále méně závažnou atrofii hipokampu [21].

2.2. Biomarkery ACH

ACH je nejvíce charakterizována přítomností extracelulárních amyloidních plaků a intracelulárního hyperfosforylovaného tau proteinu, tvořícího neurofibrilární klubka. Při tomto onemocnění vzájemně korelují hladiny amyloidu β (1-42), celkového tau proteinu (t-tau) a fosforylovaného tau proteinu (p-tau) v CSF [22–24]. Tyto základní biomarkery CSF mají vysokou diagnostickou přesnost, citlivost a specifitu [25, 26]. Patobiologický rozptyl hodnot těchto biomarkerů bohužel zabraňuje docílení 100 % diagnostické přesnosti. Nicméně, biomarkery CSF mohou pomoci s diagnostickým rozhodováním a mají obzvláště dobrou negativní prediktivní hodnotu, tj. že fyziologické koncentrace všech tří biomarkerů u pacienta s mírnými poruchami paměti téměř vylučují Alzheimerovu chorobu [18, 27–30].

Produkce amyloidu β a formování plaků začíná roky před klinickým průběhem ACH, zrychluje se v rané fázi, během preklinického stavu, ve kterém nejsou klinické či neuropsychologické změny znatelné. Ve chvíli kdy ukládání A β dosáhne maxima, u pacientů se projeví MCI a vlastní syndrom demence. V tomto stádiu nemoci se formují neurofibrilární klubka, zvětšuje se podíl gliózy a ztráta neuronů. Tento stav se dále zhoršuje do klinického stavu plnohodnotné demence.

Ingelsson a jeho kolegové porovnávali neuropatologické změny v mozku, u pacientů s ACH a kontrolních zdravých jedinců, ve snaze definovat časový průběh těchto patologických změn. Z této studie vyplynulo, že akumulace patologických změn byla výrazně zvýšená u pacientů s ACH nezávisle na délce trvání choroby, a že doba trvání demence koreluje se stupněm tvorby neurofibrilárních klubek, gliózou a synaptickými ztrátami. Patologické změny při ACH se vyskytují v sekvenčním, neuroanatomicky definovaném vzoru ovlivňujícím kortikální, subkortikální a limbické oblasti mozku [31].

Diagnostiky založené na proteinových biomarkerech v krvi jsou obzvláště žádoucí, protože tyto testy by umožnily rychlé a šetrné neinvazivní analýzy jednotlivých profilů biomarkerů. Aktivní výzkum v tomto oboru probíhá a vede k identifikaci autoprotilátek a různých proteinů v krvi, které mohou představovat specifické markery pro ACH [16].

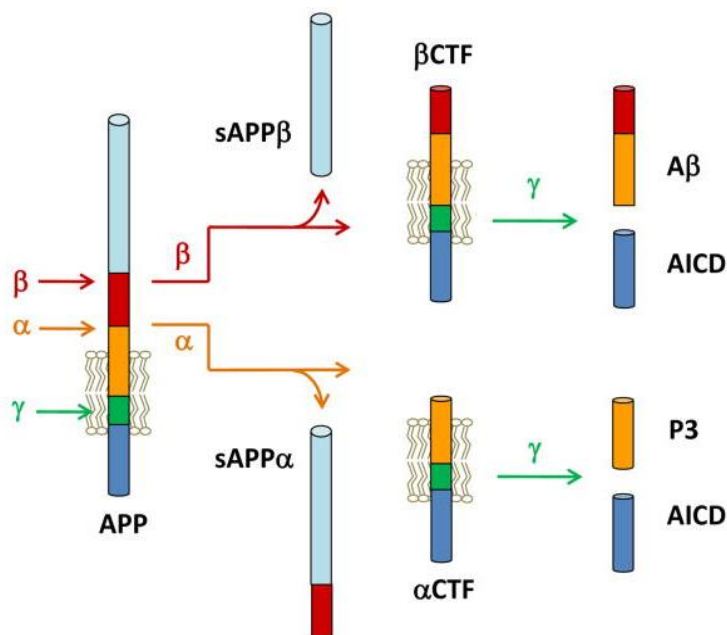
Krevní biomarkery

Krev jako biologický materiál je dostupnější než CSF, proto by krevní biomarkery byly z tohoto hlediska vhodnější pro diagnostiku. V mnoha studiích se sledovala kombinace proteinů, lipidů, metabolitů, nebo jiných látek, které byly použity k rozlišení pacientů s Alzheimerovou chorobou od zdravých jedinců [32, 33]. Další možností je měřit CNS-specifické proteiny. Ty jsou ale v krvi obsaženy v nízkých koncentracích, protože tyto proteiny podléhají degradaci plazmovými proteázami. Navíc se v krvi nachází mnoho dalších proteinů, které jsou více zastoupené, tzv. abundantní proteiny. A tyto abundantní proteiny mohou negativně ovlivnit jejich stanovení. Proto je studium biomarkerů v krvi obtížné. Nicméně, použití nových ultra-citlivých technik, například technologie digitalní array, by mohlo poskytnout potřebnou analytickou citlivost pro měření CNS-specifických proteinů [34].

2.2.1. Beta-amyloid jako hlavní biomarker ACH

Ukládání A β v mozku je primárním jevem u ACH, který teprve zahajuje kaskádu patologických změn, včetně tvorby tau neurofibrilárních klubek [35]. Uvnitř mozku je A β schopen vytvářet vysoce afinitní komplex s neurony spojený α_7 -nikotinovým acetylcholinovým receptorem, což vede k následné endocytóze A β . Zvýšení počtu neuronů s nahromaděným A β nakonec způsobí lýzu buněk a extracelulární akumulaci A β . Agregace tohoto proteinu je důsledkem změněné rovnováhy mezi syntézou proteinu, rychlostí jeho akumulace a odstraňováním [36–40].

Peptid A β vzniká štěpením amyloidního prekurzorového proteinu (APP). Tento transmembránový protein se nachází v mnoha tkáních. Jedna z jeho izoform, APP695, je tvořena 695 aminokyselinami a přednostně se exprimuje v CNS. V hustém zastoupení se vyskytuje na synaptických štěrbinách. Protein APP hraje roli při růstu buněk, neuritů, při buněčné adhezi a signalizaci buněk. Jeho post-translační úprava, při jeho anterográdní přepravě podél nervových axonů, probíhá dvěma cestami: neamyloidní a amyloidní cestou. Při amyloidním štěpení APP vzniká neurotoxický fragment A β . Proteolytické štěpení zprostředkovávají α -, β - a γ -sekretázy (Obrázek 3) [41-45].



APP – amyloidní prekurzorový protein; sAPP – velký solubilní fragment APP; CTF – membránový C-terminální fragment; A β – amyloid beta; AICD - intracelulární fragment APP domény; P3 – N-koncový fragment

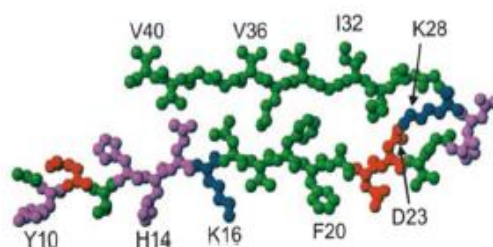
Obrázek 3 Ilustrace ukazující zpracování APP α -, β - a γ -sekretázami a jejich odpovídající produkty (upraveno dle [46]).

Proteolytické štěpení APP v poloze 17 α -sekretázou iniciuje neamyloidogenní dráhu, produkující membránový C-terminální fragment (α CTF) a velký solubilní fragment sAPP α , z N-koncové domény APP. Fragment sAPP α má neurotropní a neuroprotektivní účinky. Tento proces štěpení inhibuje amyloidogenní dráhu [47–50].

Amyloidogenní dráha je iniciována proteolytickým působením β -sekretázy v poloze 671, čímž se vytváří velký solubilní sAPP β a membránový C-terminální fragment (CTF β) neboli C99. Fragment sAPP β může mít negativní účinky, jako je například zhoršení anterográdního axonálního transportu což vede k axonální dystrofii a neuronální smrti buněk. Dále se sAPP β váže na receptor, který zahajuje apoptózu. Převládajícím typem neuronální β -sekretázy je štěpící enzym BACE1. Což je transmembránová aspartylproteáza typu I a u ACH je zvýšena. BACE1 je asociován s lipidovými rafty, na rozdíl od neamyloidní dráhy, která probíhá mimo lipidové rafty [51–55].

Dalším krokem podílejícím se jak na neamyloidogenní tak amyloidogenní dráze proteolytického zpracování APP je štěpení CTF α a CTF β fragmentů γ -sekretázou. Tato sekretáza je proteázovým komplexem uvnitř buněčné membrány skládajícím se ze čtyř

proteinů: presenilinu 1 (PEN-1), nikastrinu, anterior pharynx-defective 1 (APH-1) a presenilinu 2 (PEN-2). Tato sekretáza proteolyticky štěpí zbývající fragment APP na více místech v transmembránové doméně z CTF α a CTF β , čímž se uvolní N-koncový fragment P3 (u neamyloidogenní dráhy), A β (u amyloidogenní dráhy) a intracelulární fragment APP domény (AICD). V amyloidogenní dráze začíná štěpení v polohách 48 a 49 na C99, která uvolňuje fragment AICD, zatímco A β zůstává vázán. Sekretáza dále štěpí zbývající fragment v membráně každé 3. nebo 4. aminokyseliny, dokud není A β uvolněn z membrány. To vede k produkci A β fragmentů různých velikostí (Obrázek 4), od 37 do 46 aminokyselin s heterogenními C-konci. A β (1-42) je neurotoxický, snadno oligomerizuje a je náchylnějším k agregaci. Oligomery A β (1-42) mají nejvyšší antigenicitu. Mutace v APP a proteinu presenilinu v γ -sekretáze může vést ke změnám v průběhu tohoto štěpení [46, 56–59].



Obrázek 4 Sestava proteinu A β (1–40) navrhnutá ve studii Petkova [60]. Aminokyseliny jsou barevně odlišeny podle svých postranních řetězců - hydrofobní (zelená), polární (fialová), pozitivní (modrá), nebo záporné (červená).

Transport A β peptidů do mozku je podporován receptory pro produkty pokročilé glykace (RAGE). Kromě nikotinových acetylcholinových receptorů, se A β váže na další receptory. Těmi jsou neurotransmiterní receptory, toll-like a komplementové receptory, dále pak receptory pro produkty pokročilé glykace, a další receptory přítomné v astrocytech, mikroglíích a neuronech. Tyto interakce indukují produkci prozánětlivých molekul prostřednictvím signálních drah, z nichž většina zahrnuje aktivaci mikroglíí, a nakonec vyústí ve smrt neuronů [61–64].

Významná je korelace mezi koncentrací peptidu A β (1-42) v CSF a funkcí paměti u pacientů s MCI s amnézií, s MCI bez amnézie, a pacientů s ACH. Koncentrace A β (1-42) dosáhne rovnovážného stavu již před projevem MCI, a koncentrace tau proteinu se zvýší o více než 50 % v porovnání s jeho fyziologickými hodnotami. To vysvětluje, proč je ve fázi MCI nízká nebo dokonce neprokazatelná korelace mezi markery v CSF a neuropsychologickými výsledky testů. Je to z toho důvodu, že při začínajícím zhoršování

kognitivních funkcí jsou již CSF markery ve fázi plató. Pokles A β (1-42) v CSF ukazuje progresi onemocnění v raných fázích až do ACH a tento pokles dosahuje fáze plató pouze v plnohodnotném syndromu demence. Další progresi neurodegenerativního onemocnění už není spojována se snižováním A β (1-42) v mozkomíšním moku [10, 65].

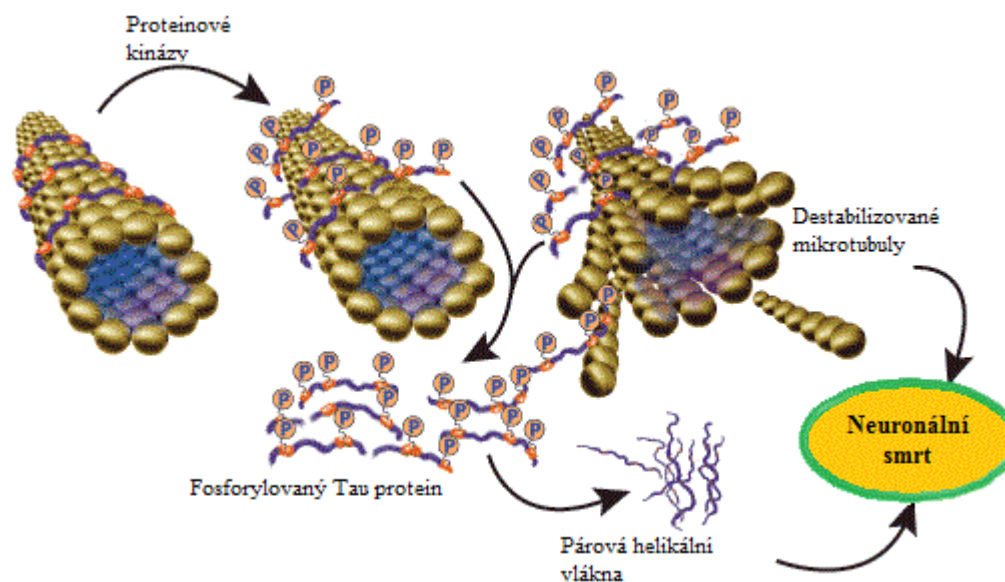
2.2.2. Tau protein a jeho úloha v patofyziologii ACH

Tau ve fyziologické konformaci je rozbalený fosforylovaný protein přítomný hlavně v axonech neuronů. Tau se váže na mikrotubuly, které stabilizuje. Mikrotubuly tvořící buněčný cytoskelet, jsou rozhodující pro udržení strukturální integrity buněk a pro přenos živin z vnitřního prostředí neuronů přes axony do synaptických zakončení [16, 66, 67]. Fyziologická fosforylace tohoto proteinu je poháněna cyklin-dependentními kinázami (CDK) a dochází k ní v mitoticky aktivních buňkách [68]. CDK jsou velmi citlivé na regulaci růstovými faktory [69]. Kináza CDK7 je aktivátorem všech ostatních CDK neboli CDK-aktivační kináza. Tato kináza je spojována s fosforylovaným tau proteinem u ACH [70]. CDK2 a CDK5 jsou u ACH zvýšené [71].

Tau protein existuje v šesti různých izoformách, které jsou výsledkem alternativního mRNA sestřihu genu pro tau protein. Tím je gen asociovaný s mikrotubuly (MAPT) na chromozomu 17 (cytogenetické umístění 17q21.1). Tyto izoformy se liší v počtu opakování vazeb mikrotubulů, a mohou existovat v izoformách s 3 (3R) nebo 4 (4R) opakováními. Lidská mozková kůra u dospělého jedince má stejný počet 3R a 4R isoform a tau exprese je zhruba dvakrát vyšší než v bílé hmotě a mozečku. Prostřednictvím tandemových opakování se tau shromažďuje do vláken, která mají příčnou β strukturu, podobnou A β . Schopnost tau se vázat na mikrotubuly je regulována post-translačními modifikacemi proteinu pomocí fosforylace, glykosylace, glykace, ubiquitinylace, sumoylace a nitrace [67, 72]. Funkce tau proteinu jsou regulovány z části v jeho fosforylovaném stavu, protože protein obsahuje více fosforylačních míst [73, 74].

Agregovaný tau protein je hlavním neuropatologickým substrátem v patofyziologii neurodegenerativních onemocnění, jako je ACH, frontotemporální demence, progresivní supranukleární paralýza, kortikobazální degenerace a chronické traumatické encefalopatie. U ACH bylo prokázáno, že hustota hyperfosforylovaných tau klubek úzce koreluje s neuronální dysfunkcí a buněčnou smrtí, čímž se odlišuje od beta-amyloidu. Diagnostické a patologické informace o ukládání tau proteinu jsou k dispozici pouze z invazivních technik, jako je biopsie mozku nebo pitva [75].

Ve všech neurodegenerativních onemocněních, ve kterých je tau patologickým prvkem (tzv. tauopatie), je tento protein v hyperfosforylované formě, která zodpovídá za jeho agregaci. Nerovnováha mezi produkcí a odstraňováním amyloidního peptidu z mozkové tkáně vede k agregaci a tvorbě senilních plaků, což stimuluje hyperfosforylaci tau proteinu [76]. A β oligomery totiž způsobují nadměrný tok iontů vápníku do oblasti kolem neuronů [77]. Takto indukovaný příliv vápníku aktivuje řetězec kináz, kdy i jedna z těchto kináz hyperfosforyluje tau protein [78]. Hyperfosforylace tau brání vazbě na mikrotubuly, což snižuje jejich stabilitu a vede ke zhoršenému axonálnímu přenosu. U ACH se agregovaný tau nachází v párových šroubovicových (helikálních) vláknech, která splynou do neurofibrilárních klubek (Obrázek 5) [16, 67, 79, 80]. Tato klubka poté vedou k synaptické a neuronální dysfunkci [81–84].



Obrázek 5 Schéma účinku proteinových kináz na tau protein (upraveno dle [251]).

V nedávné době bylo zjištěno, že patologický tau protein se může šířit z presynaptických míst na postsynaptická místa [85]. Kromě toho může být špatně složený tau protein přijat axony a může být zpětně přepravován. Ztráta synaptické funkce, která je charakteristická pro ACH a jiné tauopatie, tedy spíše zahrnuje abnormální presynaptické rozložení tau proteinu než jeho celkové zvýšení na buněčné úrovni [86].

Neurofibrilární klubka byla nejprve detekována v transentorhinální kůře u presymptomatické fáze ACH. Klubka se dále rozšiřují do limbických oblastí, což se projevuje klinickými příznaky. Klubka se nakonec začnou tvořit v asociační korové oblasti a v této době se už symptomy zhoršují [87]. Tvorba neurofibrilárních klubek může začít dříve, patologie však postupuje velmi pomalu. Pokud jsou ale přítomny senilní plaky, množství

neurofibrilárních klubek se rapidně zvyšuje. Rozdělení extracelulárních plaků A β může být proměnlivé mezi jednotlivci, ale ukládání amyloidu nejspíše začíná v oblasti cingulární kůry a pak se rozšiřuje do mozkové kůry. K tvorbě tau a A β dochází nezávisle na sobě, jejich patologie už ale může být vzájemně propojená [88, 89].

2.2.3. Klusterin a jeho úloha při ACH

Klusterin, také známý jako apolipoprotein J, je heterodimerní glykoprotein exprimovaný ve většině tkání savců [90]. Jeho převládající izoforma je sekreční protein o velikosti 75–80 kDa, ale existují i menší jaderné a cytoplazmatické verze klusterinu [91]. Přesná fyziologická úloha klusterinu není ještě odhalena, ale byla zahrnuta do různých procesů, včetně apoptózy, dopravy lipidů a komplementové regulaci, a také funguje jako molekulární extracelulární chaperon [92]. Jako chaperon je klusterin zapojen jak v propagaci, tak prevenci agregace A β , v závislosti na poměru těchto dvou látek [93].

Tvorba klusterinu je vyvolávána stresem a exprimuje se u určitých chorobných stavů jako odpověď na poškození neuronů a jejich degeneraci [90, 94]. Například jeho zvýšená exprese v průběhu buněčného stárnutí je pokládána za predispozici ke vzniku rakoviny [95].

Klusterin se nachází v amyloidních placích spolu s apolipoproteinem E (ApoE), a varianty v rámci CLU a ApoE genu byly identifikovány jako významné lokusy pro ACH [96–98].

Výsledky výzkumů ukazují na patologickou roli plazmatické hladiny klusterinu v souvislosti s ACH. Zvýšené koncentrace klusterinu v plazmě byly objeveny 10 let před depozicí A β v mozku zdravých jedinců starších 65 let [99]. Nicméně v jiné studii nebyla nalezena žádná korelace mezi koncentrací klusterinu v plazmě a rizikem incidence ACH [100]. Zde se nabízí otázka, zda jsou zvýšené plazmatické hladiny klusterinu znamením blížící se ACH nebo reakcí na patologické změny, které doprovázejí tuto chorobu. Klusterin prozatím nemůže být použit jako samostatný diagnostický marker pro ACH [6].

2.2.4. Nové biomarkery v CSF

Zkoumáním různých funkcí již známých biomarkerů se objevují nové biomarkery, které by mohly pomoci při diagnostice ACH. Jedním takovým biomarkerem je A β oligomer, který je považován za toxickou formu A β a který způsobuje synaptickou dysfunkci [101]. Ve většině studií, je u ACH tento oligomer zvýšen, ale překryv s kontrolními skupinami je

velký [102]. A β oligomery jsou zřídka detekovány v mozkomíšním moku, což omezuje jeho kvantifikaci testem ELISA a díky tomu se stává nespolehlivým biomarkrem [103]. Jsou vyvíjeny nové ultracitlivé techniky, které by mohly být užitečné pro stanovení koncentrace A β oligomerů. Savage a jeho kolegové vyvinuly metodu ELISA pro stanovení A β oligomerů za využití citlivé fluorescenční platformy, která je schopná detekovat jednotlivé fotony emitovaného záření [104].

Dalším možným kandidátem synaptického biomarkeru je dendritický protein neurogranin, který se podílí na dlouhodobé potenciaci a upevnění paměti [105]. Vysokými koncentracemi v CSF neurogranin předpovídá progresi do Alzheimerovy choroby u pacientů s mírnou kognitivní chorobou a koreluje s rychlým kognitivním zhoršením během klinického projevu [106].

Dalším novým biomarkrem je presynaptický protein SNAP25. Jeho koncentrace podstatně narůstá během prodromálního stadia nemoci. Pomocí tohoto biomarkeru by se mohla sledovat terapeutická odpověď [107].

2.3. Autoimunitní procesy u ACH

Alzheimerova choroba se objevuje především u pacientů starších 65 let také v důsledku několika vzájemně propojených patologií. Jednou z nich jsou cévní onemocnění, mezi něž je řazeno i porušení hematoencefalické bariéry. Přítomnost anti-neuronových autoprotilátek v séru nemusí mít patologický důsledek, dokud nedojde k poškození hematoencefalické bariéry a tím možnosti prostupu těchto protilátek do CNS [108].

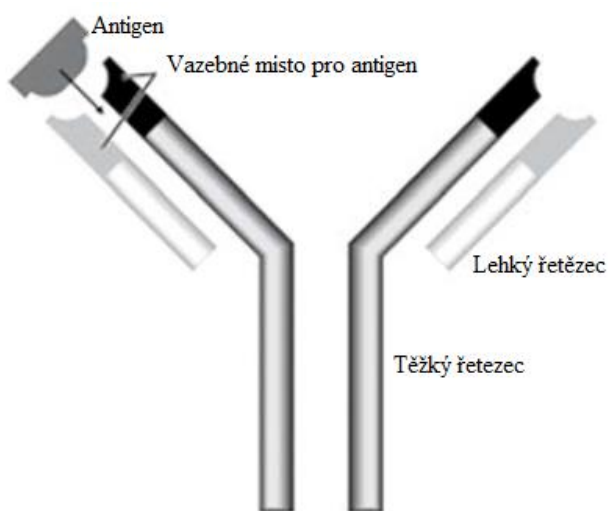
2.3.1. Imunoglobuliny

Imunoglobuliny (Ig; protilátky) jsou glykoproteiny patřící mezi základní molekuly imunitního systému. Podílejí se na obraně hostitelských systémů jako složky specifické imunitní odpovědi. Protilátky jsou součástí obranných mechanismů zejména v rámci neutralizace, opsonizace a aktivace komplementu [109, 110].

Existuje pět tříd imunoglobulinů, kdy to jsou u většiny vyšších savců třídy IgG, IgM, IgA, IgD, a IgE. Tyto třídy se liší na základě velikosti, náboje, složení aminokyselin, obsahu sacharidů, a také podle výskytu a funkce. Kromě toho je určitá heterogenita i ve třídách,

zejména u imunoglobulinů G, které dáv8 vzniknout u lidí čtyřem podtřídám (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). U imunoglobulinu A jsou například také dvě podtřídy [109, 110].

Základní strukturou protilátky jsou dva identické "těžké" polypeptidové řetězce spárované s kratšími dvěma identickými "lehkými" řetězci. Tyto řetězce tvoří přibližný tvar flexibilního Y (Obrázek 6). Řetězce jsou propojeny proměnným počtem disulfidických vazeb. Celková molekulová hmotnost jednoho takto složeného imunoglobulinu je přibližně 150 kDa [109, 110].



Obrázek 6 Schematické znázornění struktury imunoglobulinu (upraveno dle [110]).

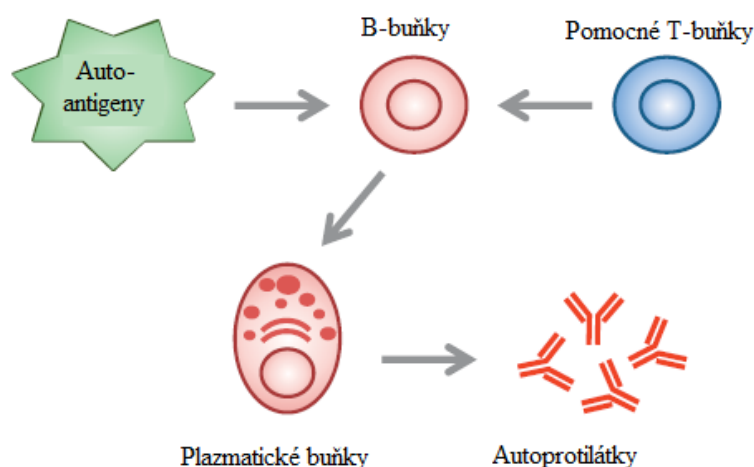
2.3.2. Pojem autoimunita

Imunitní systém chrání tělo před potenciálně škodlivými látkami (antigeny), jako jsou cizí mikroorganismy, toxiny apod. Antigeny jsou prezentované na buňkách tvořících specifické protilátky. Tyto protilátky v konečném důsledku vedou k destrukci antigenů. Bohužel, mezi antigeny mohou být zahrnuty i tzv. tělu vlastní antigeny. Produkce takovýchto protilátek často vede k destrukci zdravých tělesných tkání. Tím se vyznačuje autoimunitní reakce organismu [111].

Autoprotilátky jsou tvořeny za fyziologických nebo patofyziologických podmínek (Obrázek 7). Fyziologicky se přirozené autoprotilátky produkují při rozpoznání vlastního antigenu (autoantigenu), aby se usnadnilo poznávání a odstranění mrtvých či umírajících buněk [112, 113]. Přirozené autoprotilátky jsou často isotypu IgM a spontánně se vytvářejí během vývoje B-buněk. Polyreaktivní přirozené protilátky jsou obvykle s nízkou afinitou k vlastním antigenům a jsou primárně produkovány B-buňkami [114]. Přirozené protilátky

usnadňují fagocytózu apoptotických buněk a inhibují zánětlivé cesty. Z tohoto důvodu mají přirozené protilátky klíčovou roli v tlumení zánětu a udržování imunitní tolerance [112].

Produkce protilátek s vysokou afinitou, převážně třídy IgG, je podporována zánětem a infekcí, které vyvolávají protilátkovou afinitní maturaci směrem k zacílení na vlastní antigeny. Zhroucení imunitní tolerance je hlavním mechanismem vedoucím k patogenní produkci autoprotilátek a k autoimunitnímu onemocnění. Navázáním na vlastní antigen s vysokou afinitou patogenní protilátky zahajují a udržují zánětlivou kaskádu odpovědnou za poranění tkáně [115].



Obrázek 7 Schematické znázornění vzniku autoprotilátek. B-buňky rozpoznávají endogenní složky v těle jako antigeny (autoantigeny). Současně při stimulaci pomocných T-buněk, se B-buňky diferencují na plazmatické buňky, které produkují protilátky specifické vůči autoantigenu (autoprotilátky) (upraveno dle [116]).

Autoimunitní reakce T-lymfocytů namířených proti centrálnímu nervovému systému se tedy především opakovaně podílí na chronických zánětech neuronů, následně destrukci mozku a míchy. Svoji roli hraje také skutečnost, že CNS je "imunitně privilegovanou tkání". Imunitní privilegium je evoluční adaptací zaměřené na ochranu zvláště důležitých orgánů před zánětlivými účinky. Právě jako jsou i orgány CNS – např. oči, mozek a mícha. Dříve se všeobecně myslelo, že jakákoliv činnost imunitního systému v CNS je známkou patologie [111, 252].

Autoimunitní proces způsobuje řadu lidských onemocnění, jako je Graves-Basedowova choroba, systémový lupus erythematosus, roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, sklerodermie, myasthenia gravis a další. I když jsou příčiny autoimunitních poruch různorodé a obvykle široké, specifické cíle autoprotilátek charakterizují každé jednotlivé autoimunitní onemocnění. Například myasthenia gravis je dobře známé lidské autoimunitní

onemocnění. Při této nemoci je porušen přenos vzruchu mezi nervem a svalem. Tato porucha je způsobena autoprotilátkami vázajícími se na receptory pro acetylcholin. To zapříčiní nedostatečný nervový impuls pro zahájení či udržení pohybu svalových buněk [117, 118].

ACH je řazena k autoimunitním onemocněním a toto zařazení poskytuje důležitou vazbu mezi vaskulární patologií (změnou hematoencefalické bariéry) a neuronální smrtí buněk [108, 119].

2.3.3. Autoimunita u ACH

Infiltrace imunitních buněk do mozku byla považována desítky let za patologický proces, při kterém imunitní buňky zaútočily na centrální nervový systém (CNS). Tento proces je pozorován u zánětlivých autoimunitních onemocnění, například roztroušené sklerózy (RS). Jako neurozánětlivé procesy v parenchymu CNS jsou běžné jiné patologické stavy CNS bez ohledu na jejich etiologii, včetně neurodegenerativních poruch, jako je Alzheimerova choroba a amyotrofická laterální skleróza (ALS). Tyto patologické stavy jsou často srovnávány s MS, ale na rozdíl od ní reagují na imunosupresivní léčbu [111].

Imunitní systém funguje jako propracovaný systém brzd a protivah, který koordinuje a ukončuje imunitní odpověď při poranění tkáně v nervovém systému. V CNS jsou imunitní reakce pečlivě kontrolovány, aby se vyloučilo poškození citlivé tkáně s omezenou schopností regenerace. Převládající typy buněk v CNS, gliové buňky a neurony, selektivním způsobem reagují na širokou škálu cytokinů a komunikují přímo i nepřímo s imunitními buňkami. Specializované endotelové buňky hematoencefalické bariéry poskytují adaptivní selektivní bariéru pro doplňování imunitních buněk do CNS. V CNS je omezen proces prezentace antigenu, ačkoli většina buněčných typů (mikroglie, astrocyty a dokonce neurony) může pod řádnou stimulací produkovat hlavní histokompatibilní komplexy. Imunitní odpověď v CNS se výrazně liší od imunitní odpovědi v jiných cílových orgánech [120–122].

Z výsledků studií vyplývá, že autoimunitní onemocnění má také pozitivní efekt na homeostázu, a že hraje klíčovou roli v udržování CNS po poškození. Konkrétně bylo zjištěno, že autoimunní T-buňky usnadňují léčebné procesy v CNS v případech sterilních mechanických poranění mozku nebo míchy, psychického stresu a dalších. Ještě větším překvapením je podpora těchto T-lymfocytů v základních procesech mozkové funkční integrity, například při udržování celoživotní plasticity mozku včetně prostorového učení, paměti a neurogeneze [111, 123].

Důležité je, že autoimunní T-buňky jsou součástí buněčné sítě, efektivně a bezpečně pracují a vyžadují přísné nařízení od jiné populace imunitních buněk, jako jsou například regulační T-buňky, nezbytné pro udržování imunologické tolerance a homeostázy [111, 124].

Dysregulace rovnováhy mezi periferním potlačením imunity na jedné straně a ochrannou autoimunitou na straně druhé, je základním mechanismem při vzniku a progresi odezvy zánětů spojených s chronickými neurodegenerativními onemocněními mozku a stárnutím. Zmírnění chronického zánětu neuronů za těchto podmínek vyžaduje spíše aktivaci než potlačení periferní imunitní odpovědi namířené proti vlastní tkáni [111].

Stárnutí imunitního systému, může vést ke vzniku chorob. Tyto choroby jsou ve vegetačním klidu, dokud je imunitní systém udržován pod kontrolou [123, 125]. Toto tvrzení podporuje fakt, že funkční integrita imunitního systému je spojena s funkční integritou mozku. Dále mnoho z kognitivních dysfunkcí pozorovaných u imunitně kompromitovaných mladých myší je podobných jako u poklesu kognitivních funkcí souvisejících s věkem. To nám ukazuje, že stárnutí mozku může být způsobeno jen zhoršeným nebo dysfunkčním imunitním systémem [126, 127]. A skutečnost, že chronické neurodegenerativní onemocnění se objevuje dříve u imunitně kompromitovaných zvířat, toto jen dokazuje [128]. Také u pacientů, s chronickým neurodegenerativním onemocněním, koreluje toto onemocnění se zrychlenou imunosenescencí. Imunosenescence jsou změny v imunitním systému související se stárnutím, které v různé míře zasahují do imunitní obrany organismu, avšak nevedou k jeho utlumení ale naopak k celkové remodelaci [129–131].

K probíhajícímu autoimunitnímu procesu přispělo také zjištění, že imunoglobuliny (Ig), které byly detekovány v séru, mozkomíšním moku a v amyloidních placích nemocných ACH, mají spojitost s cévním amyloidem. Několik dalších studií prokázalo přítomnost Ig v neuronech, ale žádná z těchto studií nespécifikovala procenta neuronů pozitivních na Ig. Bohužel, význam neuronových autoprotilátek byl dříve přehlížen, z velké části díky podobným množství autoprotilátek v séru kontrolních vzorků a vzorků od pacientů s ACH [132–134].

Další studie se zajímaly o zánětlivý profil těchto Ig-positivních neuronů. V těchto neuronech byla zjištěna přítomnost složek komplementu, např. protein C1q a komplex C5b-C9. To naznačuje na neuronální buněčnou smrt zprostředkovanou aktivací komplementu klasickou cestou. Komplement je součástí nespecifické humorální obrany organismu a jeho součástí je mnoho kaskádovitě se aktivujících proteinů. Protein C1q se účastní aktivace klasické cesty komplementu navázáním na Fc fragment protilátky a komplex C5b-C9 ukončuje aktivaci komplementu vytvořením póru v membráně terčové buňky [108, 135, 136].

Složení CSF je do značné míry imunosupresivní, převažují protizánětlivé cytokiny, jako je interleukin-13 (IL-13) a transformační růstový faktor beta-2 (TGF β -2). Toto imunosupresivní prostředí je společným rysem mnoha imunitně privilegovaných míst. Buňky imunitního systému a jejich sekretované produkty (zejména, IL-6, TNF-alfa, makrofágy a žírné buňky) pak mohou hrát negativní i pozitivní role v závislosti na jejich množství a načasování jejich činnosti [121, 137, 138].

2.3.4. Disfunkce hematoencefalické bariéry

Autoimunitní onemocnění tedy mohou postihnout i CNS. Aby se však mohly imunoglobuliny dostat do mozku, musí být narušena schopnost udržení integrity hematoencefalické bariéry. Tato bariéra je hlavním modulátorem pro filtraci důležitých látek a živin pro CNS, a která je v první řadě postavena z endoteliálních buněk a astrocytů. K poruše hematoencefalické bariéry může dojít při poranění hlavy, a za podmínek obvykle spojených se stárnutím, jako jsou například ateroskleróza, hypertenze [139], cévní mozková ischemie a mrtvice [140, 141]. Všechny tyto faktory jsou rizikovými i pro ACH. Změna hematoencefalické bariéry je dále spojována s mutacemi genu ApoE. Porucha této bariéry vede k rozsáhlému úniku tekutiny mimo cévní řečiště, obsahující sérové IgG, do nervové tkáně, konkrétně do oddělených kortikálních a subkortikálních míst, včetně hipokampu [142, 143].

Ve skutečnosti má zhoršená funkce této bariéry katastrofální důsledky. Jedna z neuropatologických vlastností amyloidních plaků v mozkové kůře je tvorba amyloidních usazenin v mikrocévkách. Ty se účastní degenerace endotelu, poškození buněk hladkého svalstva a pericytů. Amyloidní usazeniny jsou také spojeny s abnormálními změnami bazální membrány. Poškození cév je jednou z hlavních patologických rolí A β při ACH [144, 145].

Koncentrace albuminu a haptoglobulinu při ACH jsou významně vyšší v mozkomíšním moku, a to v souvislosti se zvýšenou propustností hematoencefalické bariéry [139, 147]. Důsledky této vadné bariéry způsobují únik neurotoxických látek z plazmy do neuropilu, což vede k tvorbě plaku a neurofibrilární degeneraci [140, 146].

2.3.5. Výskyt autoprotilátek při ACH

Současné koncepce patogeneze ACH zahrnují účast zánětlivých a autoimunitních složek. Anti-neuronální autoprotilátky byly detekovány v séru pacientů s ACH, ale jejich význam je stále nejasný a jejich použití jako diagnostického nástroje byl dříve částečně vyloučen v důsledku přítomnosti podobných množství těchto protilátek i u zdravých jedinců. Předpokládá se, že pouhá přítomnost anti-neuronových autoprotilátek v séru nevede sama o sobě k patologickým důsledkům. Pokud je však hematoencefalická bariéra dysfunkční, tyto protilátky se mohou vázat na své cílové antigeny a vyvolat nebo alespoň přispět k patologickým rysům nemoci, včetně cytopatologických změn a ztrátě buněk. Specifické protilátky pro ACH by mohly sloužit jako užitečné diagnostické markery pro tuto nemoc. Odlišné specifity a potenciální role autoprotilátek detekované v séru nebo mozkomíšním moku u pacientů s ACH jsou shrnuty v tabulce 1 [6, 108, 148–150].

Tabulka 1 Specifita, potencionální role a užitečnost autoprotilátek jako biomarkeru u ACH (upraveno dle [116, 149]).

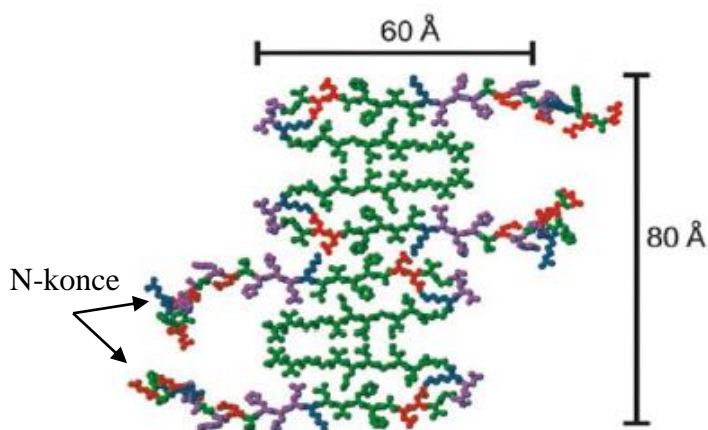
Cílové epitopy	Potenciální role spec. auto-Ab	Použití jako biomarker
β-amyloid	protektivní	ano
fosforylovaný tau protein	protektivní	pravděpodobně
oxLDL	částečně protektivní	pravděpodobné
gangliosid GM1	patogenetická	ano
glutamát	patogenetická	ano
dopamin	patogenetická	ano
hydroxytryptamin	patogenetická	ano
protein S100b	patogenetická	ano
aldoláza	neznámá	ano
rabaptin	neznámá	ne
receptory pro produkty pokročilé glykace	neznámá	neznámá
ATP-syntáza	patogenetická	ano
redox-reaktivní protilátky	neznámá	ano

Vysvětlivky: Ab – protilátka; oxLDL – oxidovaný lipoprotein s nízkou hustotou

Protilátky proti beta-amyloidu

A β peptid se odštěpuje z transmembránového amyloidního prekurzorového proteinu jako hydrofobní peptid se 40 a 42 aminokyselinami, který má tendenci polymerovat. Některé polymerní jednotky A β jsou přítomny v mozku pacientů s ACH, současně s malým množstvím rozpustných A β monomerů a oligomerů, stejně jako velké množství nerozpustných A β fibril v amyloidních plácích a cévních usazeninách. Z těchto tří polymerních jednotek jsou oligomery nejvíce neurotoxické, a vedou k poškození a smrti neuronů v mozku pacientů s ACH [151–153].

Přirozeně se vyskytující protilátky proti beta-amyloidu jsou přítomny v séru jak u pacientů s ACH, tak i u osob bez demence [154]. Tyto protilátky specifické proti β -amyloidu pomáhají udržovat β -amyloidní homeostázu [155]. Anti-A β protilátky v intravenózních imunoglobulinech (IVIG) rozpoznávají konformačně specifické epitopy, jakož i lineární epitopy z různých oblastí peptidu A β . Protilátky proti A β v krevním oběhu, zejména ty s vysokou aviditou, jsou často maskovány vytvořením imunokomplexu s ligandem. Přirozené anti-A β protilátky mají schopnost zabránit oligomerům A β vyvolávat neurotoxický účinek a napomáhají k jeho rychlejšímu odbourání ve formě imunokomplexu. Tento neuroprotektivní účinek může odrážet léčebný potenciál přirozeně se vyskytujících protilátek proti A β , nalezených v IVIG, pro léčbu pacientů s ACH [154]. Přirozeně se vyskytující A β -protilátky rozpoznávají epitop A β na jeho N-konci, aminokyseliny 1–15 [156]. Zatímco protilátky produkované aktivní imunizací se vážou na užší epitop A β (4–10) (Obrázek 8) [157]. Protilátky proti epitopům na N-konci A β jsou účinnější než protilátky cílené na C-koncové nebo centrální epitopy při odbourávání plaku u transgenních myší [270], a také při inhibici cytotoxicity a vzniku fibril [157].



Obrázek 8 Možný způsob vytváření fibril. Sestava oligomerů začíná ve střední části a C-koncové části A β peptidů. Aktivní imunizace vede ke vzniku protilátek cílených na N-konec A β peptidu, protože pouze N-koncová část je k dispozici pro interakci s T-buňkami (upraveno dle [158]).

Výsledné hladiny autoprotilátek A β v séru nebo plazmě u pacientů s ACH ve srovnání se zdravými jedinci jsou v současnosti sporné. Několik vědeckých skupin zjistilo, že sérové hladiny volných, s antigenem nevázaných A β -autoprotilátek byly u pacientů s ACH nižší než u zdravých kontrol [159–161]. Zatímco jiné vědecké studie uváděly vyšší hodnoty těchto protilátek u pacientů s ACH [162], nebo některé studie dokonce nenašly žádné rozdíly mezi pacienty a kontrolami [163–165]. Gustaw a jeho kolektiv poukazuje na to, že autoprotilátky proti A β jsou nejen ve volném stavu, ale i ve stavu vázaném na antigen, a tedy tvořící imunokomplexy s A β peptidy. To může být důvodem nesouladu ve výsledcích různých studií. Následně při stanovení sérových A β -protilátek, ale s využitím kyselé disociace A β -imunitních komplexů, zjistili vyšší úroveň A β -autoprotilátek u pacientů s ACH ve srovnání se zdravými kontrolami [166, 167]. Za použití podobného postupu Klaver s kolegy mezi oběma skupinami nezjistili žádné rozdíly [168].

Jak bylo zjištěno, pasivní imunizace APP-transgenních myší s anti-A β protilátkami snižuje cerebrální ukládání amyloidu a zlepšuje kognitivní funkce u myšího modelu ACH [36, 169, 170]. Pasivní imunizace IVIG u pacientů s ACH zlepšuje jejich kognitivní funkce. IVIG obsahují přirozené protilátky nebo monoklonální protilátky proti A β . Zdá se, že infúze IVIG uvolňuje A β z CNS do krevního řečiště. Aktivní imunizace proti A β je schopna zabránit následnému ukládání β -amyloidu. Klinická studie s použitím aktivní imunizace proti A β u lidí však byla zastavena vzhledem k rozvoji akutní meningoencefalitidy, cerebrální amyloidní angiopatie a perivaskulárního zánětu [149, 171–173]. Proto i tyto autoprotilátky mohou být za určitých podmínek patogenní [116]. Nicméně už bylo vyvinuto několik nových přípravků schopných poskytnout protilátky proti A β , ať aktivní nebo pasivní strategií imunizace, a které již dosáhly klinického testování [149, 174, 175].

Protilátky proti fosforylovanému tau proteinu

Tvorba neurofibrilárních klubek je dalším neuropatologickým charakteristickým znakem ACH. Autoprotilátky proti tau nejsou převládající ve srovnání s protilátkami proti A β . Anti-tau autoprotilátky byly jen zřídka detekovány u pacientů s neurodegenerativními chorobami. To naznačuje, že tau protein je velmi špatným autoantigenem [176]. Rosenmann a jeho kolektiv detekovali jak autoprotilátky proti fosforylovanému, tak i proti nefosforylovanému tau proteinu. U pacientů s ACH byly IgM protilátky mírně vyšší ve srovnání se zdravými kontrolami [177]. Role a funkce těchto

protilátek musí být objasněna v dalších studiích, jakož i jejich příspěvek k patofyziologii ACH [178].

Předpokládá se, že anti-tau terapie může být klinicky účinnější než anti-A β terapie. Tau patologie totiž lépe koreluje s kognitivní poruchou. Počáteční testování na zvířecích modelech prokázalo, že aktivní nebo pasivní imunizace tau proteinem snížila tau patologii a zlepšila kognitivní funkce [179, 180].

Protilátky proti oxidovaným lipoproteinům s nízkou hustotou

Je stále více zřejmé, že metabolismus lipidů, oxidační stres a zánětlivé mechanismy se mohou rovněž podílet na patogenezi ACH. A β -peptid, který se sdružuje s lipoproteinovými částicemi jak v mozkomíšním moku, tak i v plazmě, vyvolává oxidaci různých biomolekul [181]. Ve skutečnosti jsou CSF lipoproteiny u pacientů s ACH více náchylné k oxidaci a vyvolávají neurotoxicitu [182]. Oxidované lipoproteiny s nízkou hustotou (oxLDL) jsou vysoce imunogenní a vyvolávají vznik systémových protilátek s významnými funkčními vlastnostmi [183]. Přítomnost protilátek vázajících se na oxLDL v mozkomíšním moku pacientů s neurodegenerativní demencí a u zdravých jedinců hodnotil Kankaanpää a jeho kolegové. Titry IgG protilátek proti oxLDL v CSF byly významně zvýšeny u pacientů s ACH ve srovnání s pacienty s frontotemporální lobární degenerací a zdravými jedinci. Tyto nemoci jsou dvěma nejběžnějšími, které způsobují neurodegenerativní demenci. Funkce a úloha těchto protilátek v mozkomíšním moku, a především jejich užitečnost jako biomarkerů v diferenciální diagnostice nebo při sledování progresu nemoci a léčebné odpovědi u ACH, jsou neznámé [149, 184].

Protilátky proti gangliosidu GM1

Gangliosidy jsou kyselé glykofosfolipidy lokalizované ve vnější vrstvě plazmatické membrány. Ačkoli jsou známé údaje o gangliosidových strukturách a metabolismu, méně je toho známého o jejich funkci. Gangliosidy nejspíš hrají důležitou roli ve vývoji neuronů, jakož i v jejich regeneraci, zatímco protilátky proti gangliosidům tyto procesy narušují. Biochemické studie prokázaly, že lipidové složení plazmatické membrány, včetně gangliosidu a cholesterolu, přísně kontroluje tvorbu beta-amyloidu [185]. Gangliosid GM1 se pevně váže k A β -peptidu a může inhibovat jeho konformační změny [186]. Několik studií ukázalo zvýšení anti-GM1 titrů v séru pacientů trpících ACH. Protilátky proti GM1 mohou způsobit

demyelinizaci periferních nervů. Hatzifilippou a jeho kolegové prokázali korelaci mezi přítomností anti-GM1 protilátek typu IgM v séru a závažností demence [187].

Protilátky proti neurotransmiterům

Průběh progresu ACH se projevuje i globální ztrátou neurotransmiterů. Acetylcholin strmě klesá a mnoho dalších neurotransmiterů také vykazuje pokles, včetně hydroxytryptaminu (HT), noradrenalinu, dopaminu, glutamátu a kyseliny γ -aminomáselné. Mnoho neurotransmiterů je dysfunkčně zapojeno do kognitivní poruchy ACH, a přesto je nedostatek údajů týkajících se autoimunity proti neurotransmiterům u demence ACH. Autoprotilátky proti glutamátu byly nalezeny v krevní plazmě pacientů s ACH. Obsah autoprotilátek proti glutamátu v krevní plazmě pacientů se středně těžkou demencí byl dvakrát vyšší ve srovnání s pacienty s lehkou demencí. Obsah autoprotilátek proti glutamátu u pacientů s časným nástupem ACH byl mnohem nižší než u pacientů s pozdním začátkem ACH. Důležité také je, že plazmatické koncentrace imunitních komplexů a protilátek proti serotoninu a dopaminu byl vyšší u pacientů s ACH ve srovnání se zdravými pacienty stejného věku. Zejména plazmatické koncentrace protilátek proti serotoninu a dopaminu klesají s nárůstem doby trvání onemocnění [188]. Gruden a jeho kolektiv zjistili, že protilátky proti HT jsou zvýšeny během lehké demence a plató fáze, potom slouží jako marker ACH bez souvislosti s dobou trvání nemoci. Protilátky mohou hrát roli při snižování obsahu HT při rozvoji demence ACH, a to prostřednictvím vazby a odstranění neurotransmiteru z funkčních míst v mozku [189, 190].

Protilátky proti proteinu S100B

S100B je kyselý, vápník vázající protein produkovaný astrocyty. Tento protein byl vybrán, kromě A β oligomerů, jako druhý antigen související s atrofickými procesy v mozku při ACH [191]. Fyziologicky protein S100B působí jako cytokin produkovaný astrocyty, který podporuje přežívání neuronů a jejich vývoj, a dále podporuje syntézu APP v neuronech a neuritech [192]. Naopak nadměrná exprese proteinu S100B vyvolává dystrofické změny v neuritech, které na ně reagují a benigní transformací tvoří amyloidní depozity v neuritických placích odpovědných za kortikální atrofii při ACH [193].

Studie uvádí přítomnost autoprotilátek proti S100B v sérech pacientů s ACH, ale hladina autoprotilátek u pacientů s ACH se shodovala s těmi s vaskulární demencí a se zdravými kontrolami [194]. Pozdější studie ukázaly, že hladiny protilátek S100B vykazují

dvoufázový vztah se stadiem demence. Jejich koncentrace stoupá během mírné až střední fáze, v mírné až těžké fázi naopak klesají [189].

Protilátky proti aldoláze

Mor a jeho kolektiv se snažili identifikovat potenciální autoantigeny u pacientů s ACH testováním jejich sérových IgG. Pomocí metody imunoblotu sledovali specifity protilátek proti strukturám v mozku z buněčných lysátů. Identifikovali aldolázu jako nový autoantigen u 50 % sér. Aldoláza je glykolytický enzym katalyzující reakci, která konvertuje fruktózu-1,6-bisfosfát na glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyacetonfosfát. V sérech pacientů s ACH inhibují tyto protilátky aktivitu enzymu. Afinity anti-aldolázových protilátek byla významně zvýšena přidáním substrátu fruktóza-1,6-bisfosfátu. Toto zjištění by mohlo naznačovat, že *in vivo* imunitní odpověď proti enzymu by mohla být poháněna komplexem enzym-substrát. Anti-aldolázové protilátky mohou představovat průvodní jev: neuronální apoptóza vede k uvolnění obsahu buněk, včetně aldolázy, a to má za následek autoimunitizaci. Na druhé straně, tyto protilátky by mohly mít patogenní účinky tím, že inhibují výrobu a využití energie z glukózy. Také by anti-aldolázové protilátky mohly zase pomoci s odstraňováním plaku, stejně jako je tomu u anti- β -amyloidních protilátek. To by nasvědčovalo příznivé ochranné imunitní reakci [149, 195].

Protilátky proti rabaptinu

Podle další teorie mohou mít specifické protilátky proti mikrovaskulárnímu endotelu roli v porušení hematoencefalické bariéry, anebo v indukci aktivace apoptózy v endotelových buňkách. Použitím strategie molekulárního klonování identifikoval Delunardo a jeho kolektiv rabaptin 5 (RABPT5) jako nový endoteliální autoantigen u ACH. Až u 65 % pacientů s ACH byl nalezen sérový IgG proti RABPT5. RABPT5 reguluje uvolňování neurotransmiterů a neuritů [196]. Přítomnost abnormalit v endocytických dráhách v neuronech představuje nejstarší patologický rys sporadické ACH. Sekvence aminokyselin RABPT5 vykazuje velmi zvýšený stupeň homologie s aminokyselinovou sekvencí neurorescinu, faktorem růstu neuritů, který může přispět k opětovné regeneraci poškozených neuronů u neurodegenerativních onemocnění [197].

Existuje několik teorií o patogenním významu anti-RABPT5 protilátek. První z nich je, že by mohly být průvodním jevem v důsledku nahromadění apoptotických endoteliálních buněk. Druhou možností je, že anti-RABPT5 protilátky vstupují do neuronů a tvoří

imunokomplexy s proteiny, čímž brání jejich funkci. To by mohlo vést k inhibici endosomální membránové fúze, která buňce poskytuje cytoprotektivní mechanismus proti ukládání β -amyloidu. Poslední hypotézou je, že anti-RABPT5 protilátky by mohly hrát patogenetickou roli při křížové reakci s neurocrescinem a tím zabraňovat jeho schopnosti znovu zregenerovat poškození neuronů [149].

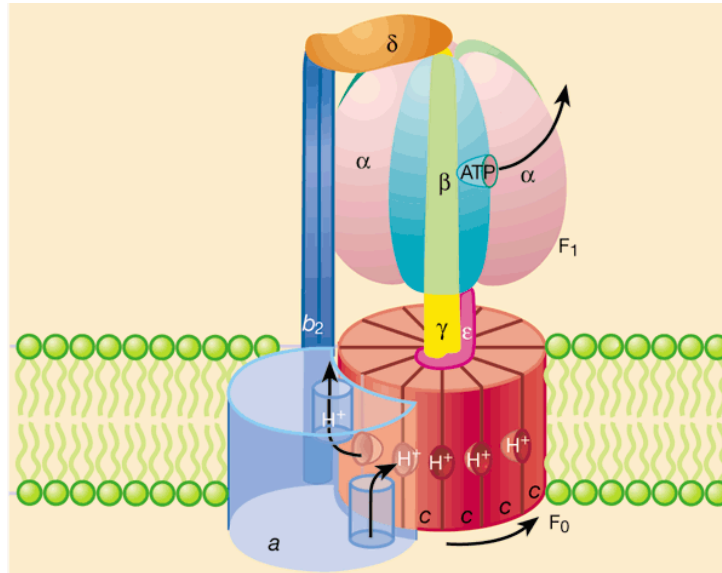
Autoprotiilátky proti receptoru pro produkty pokročilé glykace

Receptory pro produkty pokročilé glykace (RAGE) byly identifikovány jako hlavní receptory na hematoencefalické bariéře zprostředkovávající tok $A\beta$ z krve do mozku [198]. U diabetu a ACH byly zjištěny rysy autoimunity a v obou onemocněních jsou přítomny vysoké hladiny produktů pokročilé glykace a jejich receptorů v tkáních a v periferní krvi. Současně se v oběhu vyskytovaly vysoké titry protilátek proti RAGE-like peptidu. Novější studie neprokázaly konzistentní vztah mezi anti-RAGE protilátkami a kognitivními funkcemi [199]. To znamená, že možnost anti-RAGE protilátek v krvi jako biomarkeru pro ACH zůstává nejednoznačná [116]. Mruthinti a jeho kolektiv uvádějí, že anti-RAGE IgG titry byly zvýšeny u pacientů s diabetem a současně i ACH. U nich byla silná lineární korelace mezi titry RAGE a $A\beta$, což naznačuje, že tyto dva peptidy existují v plazmě v těsném komplexu. Tyto výsledky podporují koncept možného vztahu mezi diabetem a ACH. Ve skutečnosti je jak onemocnění, tak rozvoj autoimunitní reakce, vyvolané zvyšujícím se věkem a přítomností amyloidních peptidů, klíčovým faktorem přispívajícím k cytotoxicitě [149, 200].

Protilátky proti ATP-syntáze

Pomocí imunoproteomického přístupu s využitím myší mozkové bílkoviny, Vacirca a kolektiv identifikovali beta podjednotku syntázy ATP jako nový autoantigen u ACH. Mitochondriální ATP-syntáza je enzym odpovědný za složité syntézy ATP z ADP a anorganického fosfátu, vedený transmembránovým elektrochemickým protonovým gradientem. ATP-syntáza se skládá ze dvou hlavních částí – první část (F₀), která je zasazená v membráně, a druhé části nasedající na tu první (F₁) (Obrázek 9). Právě ta část F₁ syntetizuje ATP na svém povrchu po navázání ADP a anorganického fosfátu. Pozoruhodné je umístění ATP-syntázy i na buněčném povrchu, např. na buněčném povrchu hipokampálních neuronů. ATP-syntáza buněčného povrchu se kromě syntézy a hydrolýzy ATP také podílí na řadě buněčných aktivit, včetně zprostředkování intracelulárního pH, buněčné odpovědi na anti-angiogenní činidla a homeostáze cholesterolu. Za použití ELISA metody byly sérové

anti-ATP-syntázové autoprotilátky detekovány v 38 % u pacientů s ACH, nebyly detekovány ve shodné věkové skupině zdravých jedinců a u pacientů s Parkinsonovou nemocí nebo aterosklerózou [149, 201].



Obrázek 9 Enzym ATP-syntáza. Část F1 se skládá ze tří alfa podjednotek, tří beta podjednotek, dále z epsilon, delta a gama podjednotky. F0 část obsahuje jednu a, jednu b a devět až dvanáct podjednotek c (upraveno dle [202]).

Redox-reaktivní protilátky

Oxidace způsobuje rozdílné demaskování protilátek v kontrolních vzorcích CSF. Tyto vzorky totiž obsahují redox-reaktivní autoprotilátky. U pacientů s potvrzenou ACH je výskyt těchto autoprotilátek v CSF nízký nebo nulový. To naznačuje, že tyto protilátky mohou být odhaleny pomocí oxidačních podmínek, které jsou v CNS u pacientů s ACH. Tyto nemaskované protilátky by se pak mohly vázat na neuronální tkáň a případně se účastnit počáteční kaskády vedoucí až k demenci u ACH. Předčasná fyziologická odhalení těchto redox-reaktivních protilátek v mozkomíšním moku pacientů s ACH může představovat cenný biomarker pro diagnostiku a progresi tohoto, a možná i dalších neurodegenerativních onemocnění [149, 203, 204].

2.4. Metody využívané pro stanovení specifických autoprotilátek u Alzheimerovy choroby

Metodou pro stanovení specifických autoprotilátek u Alzheimerovy choroby, která se nejčastěji objevuje ve studiích pojednávajících o hladinách anti-A β autoprotilátek v biologických materiálech, je metoda ELISA v mikrotitrační destičce. O metodě ELISA je pojednááno v kap. 2.4.1. Dále jsou vyvíjeny nové, citlivější metody pro stanovení anti-A β autoprotilátek, o kterých pojednává kapitola 2.4.2. Jsou v ní zahrnuty metody MELISA, western blotová metoda, mikrofluidní technika a multiplexní analýza.

Výsledné hladiny autoprotilátek proti A β v séru nebo plazmě se u skupin pacientů v jednotlivých studiích různí, jak již bylo řešeno v kapitole 2.3.5. - Autoprotilátky proti beta-amyloidu. Několik vědeckých skupin zjistilo, že sérové hladiny volných, s antigenem nevázaných A β -autoprotilátek byly u pacientů s ACH nižší než u zdravých kontrol [159–161]. To nasvědčuje představě, že u pacientů s ACH je více anti-A β autoprotilátek vázáno s amyloidem beta, tedy v séru je detekováno méně těchto autoprotilátek. Další studie uvádějí výsledné hodnoty anti-A β autoprotilátek vyšších u pacientů s ACH [162]. Jsou ale i studie kde nezjistili mezi zdravými kontrolami a pacienty s ACH žádné rozdíly [163–165, 168]. Tyto rozdíly mohou být dány různým řešením komplikací při stanovení těchto autoprotilátek v jednotlivých studiích.

Možné komplikace při stanovení autoprotilátek

Při práci s reálnými vzorky jako komplexním materiálem může dojít k několika komplikacím. V séru pacientů je mnoho proteinů, které mohou ztížit či znemožnit stanovení protilátek proteinovými interferencemi. To lze eliminovat vhodnou blokací volných míst na povrchu pevné fáze. Ve studii Klaver a jeho kolektivu (2010) porovnávali různé druhy blokačních činidel pro snížení nespecifické sorbce [205]. Dalším způsobem snížení nespecifických interakcí je izolace imunoglobulinů ze séra, kdy je vhodnější využít k izolaci imunoglobulinů thiofilní adsorpční chromatografii. Tato metoda je šetrnější pro samotné imunoglobuliny, kdy navíc nedojde k polyvalenci sledovaných anti-A β autoprotilátek [253]. Polyvalentní protilátky, které slouží jako přirozená obrana proti patogenům, obsahují hypervariabilní oblasti způsobující nižší aviditu a specifitu k antigenům [154]. V séru se mimoto vyskytují protilátky monovalentní, které se na A β váží se střední až vysokou aviditou. Zajímavým efektem je, že může docházet k polyvalenci monovalentních protilátek při kyselé

eluci imunoglobulinů během jejich izolace, například při použití Proteinu G [154, 228, 229]. Na přítomnost těchto polyvalentních protilátek je třeba brát zřetel při izolaci Ig, a nejen při ní, ale i při samotném stanovení. Například při stanovování monovalentních anti-A β protilátek, může docházet k překryvu hladin titrů protilátek mezi pacienty, pokud jsou ve vzorku i polyvalentní protilátky [154]. Přirozené polyvalentní protilátky, i ty vzniklé při přípravě vzorku, souvisí s vyššími hodnotami slepých vzorků, kdy se tyto protilátky nespecificky váží na povrch destičky či zkříženě reagují. Velkým problémem je, že tento efekt nelze odstranit běžnými blokačními činidly, zvyšuje se pozadí testu a tím se snižuje senzitivita testu [154, 205]. Možným způsobem redukce přítomnosti těchto polyvalentních protilátek je využití účinků chaotropního činidla (např. thiokyanát amonný nebo 8 M močovina). Chaotropní činidlo rozruší slabé vazby polyvalentních protilátek, čímž se sníží hladina slepých vzorků. Nedojde přitom k narušení specifických vazeb anti-A β protilátek vázajících se silnější vazbou na vazebné místo na A β peptidu [154].

Také se objevují studie, kde je řešena otázka tzv. maskovaných autoprottilátek. V patientských sérech jsou protilátky ve stavu dynamické rovnováhy mezi vázanou a nevázanou formou. Autoprottilátka a antigen, které jsou vázány vzájemně v imunokomplexu, jsou těžko detekovány, protože je maskováno jak místo pro detekci protilátky, tak antigenu. Proto jsou výsledky titrů autoprottilátek proti A β tak nesourodé. Lze totiž detekovat jen volné autoprottilátky, které nejsou vázány v imunokomplexu s A β peptidem [166–168, 230]. Ve studii Gustaw-Rothenberg (2010) stanovovali sérové protilátky proti amyloidu β (1-42) před disociací antigenu a po disociaci metodou ELISA v mikrotitrační destičce. Jejich analýzy ukázaly, že hladina protilátek po disociaci byla u pacientů s ACH vždy významně vyšší v porovnání s kontrolními vzorky. Hladiny disociovaných autoprottilátek proti A β (1-42) mají významnou diagnostickou hodnotu na počátku neurodegenerativního procesu a poté mohou být užitečným biomarkerem pro progresi onemocnění [167].

Pro správné stanovení anti-A β protilátek je třeba počítat s těmito komplikacemi, zohlednit je a vhodně přistupovat k celé metodice.

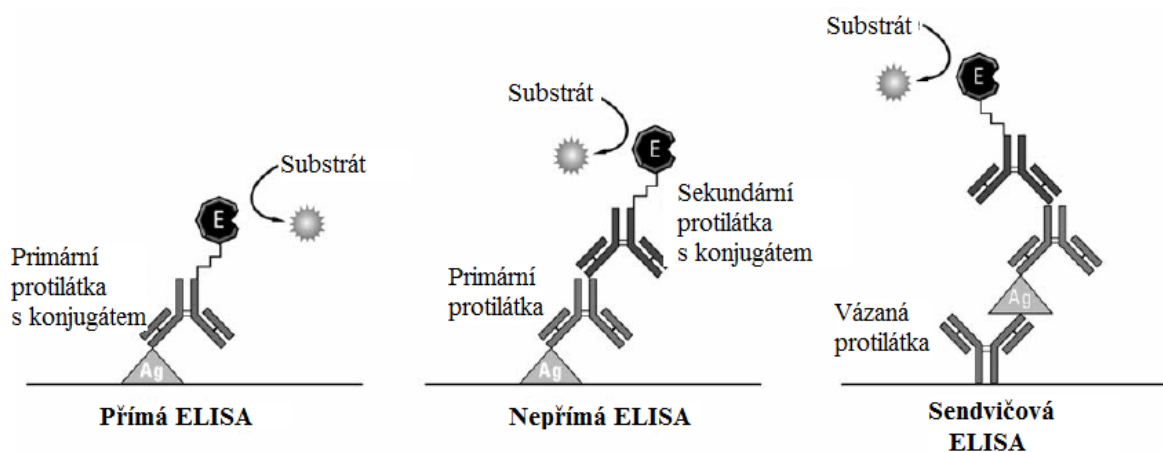
2.4.1. Enzymová imunoanalýza na pevné fázi – ELISA

Metoda enzymové imunoanalýzy na pevné fázi v nekompetitivním uspořádání (ELISA) je účinným způsobem detekce a kvantifikace specifických proteinů v komplexní směsi. Původně tuto metodu popsal Engvall a Perlmann (1971). Tato metoda umožňuje

analýzu proteinových vzorků imobilizovaných v jamkách mikrotitrační destičky s použitím specifických protilátek. Tato technika byla revolucí v imunologii a je běžně používaná v lékařských výzkumných laboratořích. Metoda ELISA má využití v komerčních aplikacích, včetně detekce infekčních protilátek a markerů v diagnostice, a také alergenů v potravinářském průmyslu [254].

Důležitým milníkem pro enzymatické metody bylo zavedení technologie umožňující produkci antigen-specifických monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky mají využití jako sondy pro detekci jednotlivých molekul v komplexních proteinových směsích nebo vzorků tkání. Zpočátku bylo detekce dosaženo použitím protilátek značených radioizotopy. To se ale z důvodu zdravotních rizik postupně vytěsnilo, když se objevila alternativa. Avramais (1966, 1969) a Pierce (1967) vyvinuli metody s chemicky značenými protilátkami. Protilátky jsou značené určitým enzymem, který v roztoku se substrátem dává měřitelný signál. S vývojem fluorescenční technologie, kdy je generován signál s použitím značených protilátek fluoroforem, je tato technologie převládající, a to zejména v multiplexních metodách [254].

Ačkoli je mnoho variant metod ELISA, různé použití a různé situace, všechny závisí na stejných základních prvcích. Nejdříve se přímo nebo nepřímo imobilizuje antigen na pevnou fázi. Tou může být povrch jamek mikrotitrační destičky, ale také se využívají nejrůznější povrchy, jako jsou sklo, polystyren a jeho deriváty, a dále také například magnetické částice [255]. Po navázání antigenu se zablokovávají nenavázaná místa na povrchu jamek přidávkem blokačního činidla – nejčastěji je to hovězí sérový albumin (BSA). Následuje inkubace se specifickými protilátkami proti antigenu. Měřitelný signál se generuje prostřednictvím enzymu přímo nebo sekundárně značkou na specifické protilátce (Obrázek 10). Detekční protilátka může být značena enzymem nebo fluoroforem generujícím signál. K enzymatické detekci se k enzymu přidává vhodný substrát. Poté se měří barevná změna roztoku v jamce mikrotitrační destičky. Například při detekci pomocí enzymu křenová peroxidáza (HRP) se jako substrát nejčastěji používá o-fenylendiamin (OPD) nebo 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) [254].



Obrázek 10 Schéma nejčastěji využívaných ELISA metod (upraveno dle [254]).

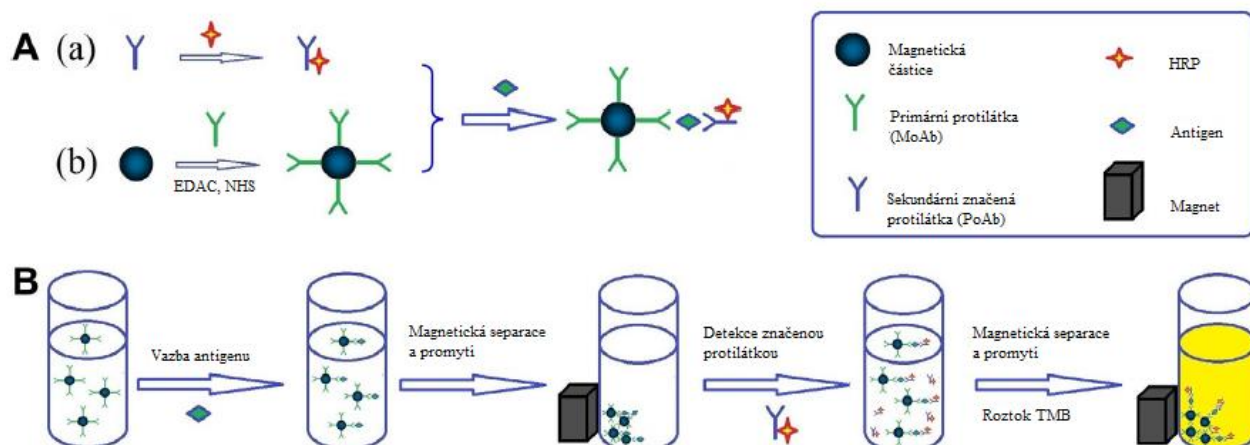
Tato metoda je zatím nejvíce vyvinutou a využívanou vzhledem ke stanovování anti-A β autoprotilátek. Používaný systém detekce je výhradně enzymatický, nejčastěji pomocí enzymu HRP. Rozpolcené pohledy na hladiny anti-A β protilátek u různých skupin pacientů je zmiňován v kapitole 2.3.5. - Autoprotilátky proti beta-amyloidu a v úvodu kapitoly 2.4. V publikacích, ve kterých je uváděno stanovení anti-A β protilátek metodou ELISA [154, 168, 205], je využíváno pouze prosté absorbce, tedy nescifické interakce, pro vazbu antigenu na povrch jamky v mikrotitrační destičce.

2.4.2. Nové metody pro stanovení autoprotilátek

Enzymová imunoanalýza s využitím magnetických částic – MELISA

Metoda enzymové imunoanalýzy na magnetických částicích (MELISA) je variantou metody ELISA s využitím magnetických částic. U metody MELISA slouží jako pevná fáze magnetické částice s imobilizovaným ligandem (Obrázek 11). U této metody je vyžadováno jen malé množství magnetických částic a ligandů. Magnetické částice totiž umožňují lepší přístup molekul/protilátek k jednotlivým epitopům/antigenům na povrchu částic [207]. Také díky reakční kinetice se oproti ELISA na mikrotitrační destičce snižuje čas provedení testu [255]. MELISA je metoda přesná, méně časově náročná, a citlivější než konvenční ELISA [208, 209]. Kombinuje výhody imunomagnetických částic s metodou ELISA, což zlepšuje přesnost a specifičnost v porovnání s běžným imunotestem [206].

MELISA byla použita například pro kvantifikaci imunoglobulinů [209] a stanovení cyklosporinu A [210].

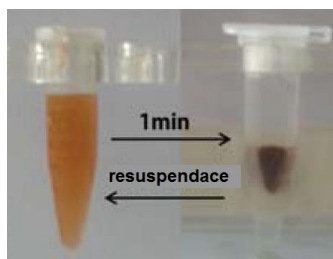


Obrázek 11 Schematické znázornění přípravy detektoru sondy (značená protilátka) [A (a)], přípravy magnetického nosiče [A (b)] a postup metody ELISA s magnetickými částicemi (B) (upraveno dle [206]).

Magnetické částice využívané při metodě MELISA

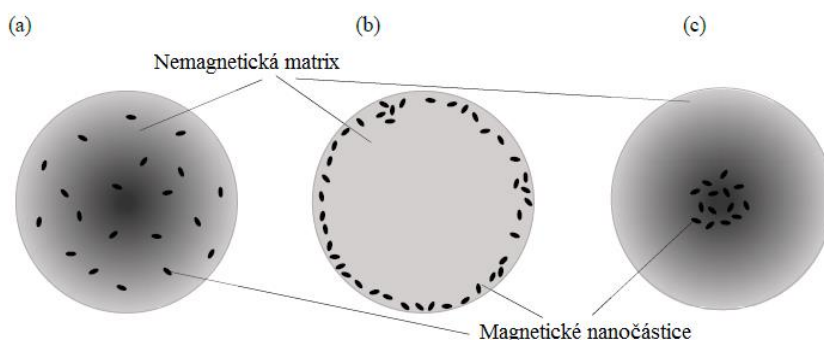
Při metodě MELISA se využívají magnetické částice jako pevná fáze, z tohoto důvodu jsou u této metody jednou z nejdůležitějších součástí. Druhů magnetických částic je už dnes nepřeberné množství.

Magnetické částice se skládají z magnetických nano- a mikročástic vložených do polymerní matrice. Velikost částic se může lišit od stovek nanometrů do několika mikrometrů [212]. Magnetické částice těží z kombinace obou prvků – magnetu a polymeru. Částice jsou superparamagnetické, což znamená, že projevují magnetické vlastnosti pouze při aplikaci vnějšího magnetického pole, což umožňuje rychlé a snadné oddělení částic z roztoku po jejich předchozím rozptýlení (Obrázek 12). Magnetická složka částic je nejčastěji z čistých kovů (Fe, Co, Ni), protože jsou tyto kovy stabilnější vůči oxidaci [213]. Také se ale hojně využívá oxidu železa – magnetitu (Fe_3O_4), a to díky jeho vynikajícím magnetickým vlastnostem [214, 215]. Ve většině případů je jako polymerní matrice používán polystyren, ale jsou využívány i nosiče na bázi celulózy, agarózy, polyethylenglykolu, chitosanu, porézního skla nebo silanizované magnetické částice oxidem křemičitým [214, 216].



Obrázek 12 Ukázka rozptýlené suspenze magnetických částic (vlevo) a chování částic pod přiloženým vnějším magnetickým polem (vpravo) (upraveno dle [209]).

Magnetické částice mohou mít různou strukturu, která je dána různým vkládáním magnetických nanočástic do nemagnetické matrice. V jednom případě jsou magnetické nanočástice rovnoměrně rozloženy v celém objemu polymerní matrice (Obrázek 13a). Jiné druhy částic jsou charakterizovány strukturou rozdílného jádra a obalu. Buďto mají nemagnetické polymerní jádro s magnetickými nanočásticemi blízko povrchu (Obrázek 13b), nebo jsou magnetické nanočástice koncentrované ve středu (Obrázek 13c) [212, 217].



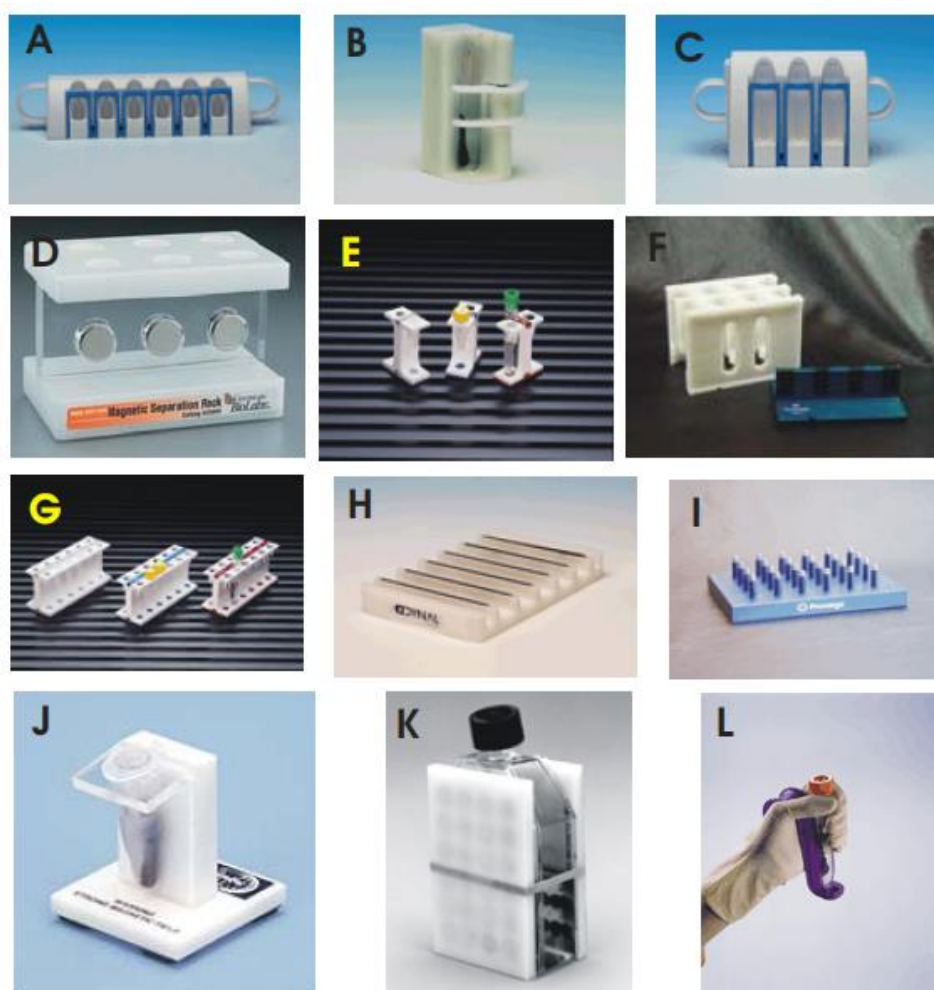
Obrázek 13 Tři varianty pro vkládání magnetických nanočástic do nemagnetické sférické matrice (upraveno dle [217]).

Komerčně jsou dostupné částice s již různými imobilizovanými afinitními ligandy na svém povrchu – streptavidinem, různými protilátkami, proteiny A nebo G, nebo částice s funkčními skupinami na svém povrchu – například $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ [216].

Využití magnetických částic má nejen výhody imunologické reakce na pevné fázi, ale i výhody vysoké specifity, může snížit čas detekce a zlepšit citlivost detekce [218].

Magnetické částice mají optimálně jednotný průměr a velikost, a jsou rovnoměrně rozptýleny v roztoku. Také mají větší povrch než ploché pevné fáze a umožňují navázání více "aktivních molekul", čímž se zvýší citlivost metody [219, 220]. Proto nejen díky možnosti funkcionalizace povrchu částic pomocí specifických ligandů, je těchto částic využíváno v imunologických metodách [221], k izolaci sekvencí nukleových kyselin [222], k izolaci buněk [223] a mikroorganismů [224, 225], a čištění proteinových směsí [226].

Magnetický nosič, nesoucí imobilizovaný afinitní nebo hydrofobní ligand, iontoměničovou skupinu atd., se přidá ke vzorku obsahujícím cílovou sloučeninu. Vzorky mohou být surové buněčné lyzáty, plná krev, plazma, ascites tekutina, mléko, syrovátka, moč, kultivační média, odpad z potravin a kvasného průmyslu, a mnoho dalších. Po inkubační době, po které je cílová sloučenina navázána na magnetické částice, je celý magnetický komplex snadno a rychle odstraněn ze vzorku za použití vhodného magnetického separátoru (příklady viz Obrázek 14). Po vymytí nečistot, může být izolovaná cílová sloučenina eluována a použita pro další práci [216].



Obrázek 14 Příklady magnetických separátorů používaných pro magnetickou separaci. **A:** Dýnal MPC - S pro šest mikrozkušavek (Dýnal, Norsko); **B:** Dýnal MPC - 1 pro jednu zkumavku (Dýnal, Norsko); **C:** Dýnal MPC - L pro tři zkumavky (Dýnal, Norsko); **D:** magnetický separátor pro šest mikrozkušavek (New England Biolabs, USA); **E:** MagneSphere technologie magnetického separačního stojánku, dvě pozice (Promega, USA); **F:** MagnaBot zařízení pro magnetickou separaci větších objemů (Promega, USA); **G:** MagneSphere technologie stojánku pro magnetickou separaci, dvanáct pozic (Promega, USA); **H:** Dýnal MPC - 96 S pro 96-jamkové mikrotitrační destičky (Dýnal, Norsko); **I:** MagnaBot 96 magnetické separační zařízení pro 96-jamkové mikrotitrační destičky (Promega, USA); **J:** Biomag Solo-Sep pro separaci v mikrozkušavce (Polysciences, USA); **K:** Biomag separátor pro baňky (Polysciences, USA); **L:** MagneSil magnetické separační zařízení (Promega, USA) (upraveno dle [216]).

Sledování zeta-potenciálu k ověření stability magnetických částic

Zeta-potenciál je indikátorem elektrostatického nebo nábojového odpuzování či přitažlivosti mezi nanočásticemi. Proto může být brán jako jeden z důležitých základních parametrů ovlivňující stabilitu nanočástic. Jeho měření přináší podrobné informace o hlavních příčinách disperze, agregace nebo flokulace, a může být použito pro zlepšení formulace disperzí, emulzí a suspenzí [256].

Dvojitá vrstva na povrchu částic je vytvořena tak, aby se neutralizovala nabitá částice, a způsobuje elektrokinetický potenciál mezi povrchem částice a jakýmkoli místem v kapalině. Tento rozdíl napětí je v řádu milivoltů, a je označován jako povrchový potenciál. Velikost povrchového potenciálu se týká povrchového náboje a tloušťky dvojité vrstvy. Sternova vrstva se na rozdíl od vrstvy difúzní považuje za pevnou vrstvu koloidu. Elektrický potenciál na hranici těchto dvou vrstev souvisí s mobilitou částice a nazývá se zeta-potenciál. I když je zeta-potenciál střední hodnotou, je někdy považován za významnější než povrchový potenciál [257].

Povrchové síly na rozhraní částic a kapaliny jsou velmi důležité. Každá částice nese elektrický náboj, který produkuje vzájemnou elektrostatickou sílu odpuzování mezi sousedními částicemi. Většinou potřebujeme maximalizovat odpudivé síly mezi částicemi za účelem udržení každé jednotlivé částice a tím zabránění jejich agregace. V případě, že je náboj dostatečně vysoký, budou částice zůstávat v suspenzi dispergované. Konkrétně jsou částice stabilní nad hranicí zeta-potenciálu 30 mV a -30 mV, tedy hodnoty potenciálu vyšší než 30 mV a nižší než -30 mV. Snížení nebo odstranění náboje má právě opačný účinek, vede tedy k neustálé agregaci částic. Složení kapaliny souvisí s nábojem, proto je možné změnou pH nebo iontové látky pozměnit i náboj částic. Další přímější technikou pro změnu náboje částic je použití povrchově aktivních látek, které se přímo adsorbují na povrch částic a mění jejich vlastnosti. Jelikož mají nanočástice přirozenou tendenci při skladování aglomerovat, jejich stabilita hraje důležitou roli [256, 257].

Western blotová metoda s imunochemickou detekcí

Metoda Western blot slouží pro detekci především určitého proteinu ve vzorku. Může být kvalitativní nebo semikvantitativní. Jde o spojení elektroforetické separace, přenosu separovaných proteinů na membránu a jejich následné detekce specifickými protilátkami. Pro separaci proteinů se využívá SDS-PAGE elektroforéza, která proteiny rozdělí podle jejich

molekulové hmotnosti. Pro přenos proteinů z gelu na membránu se nejčastěji využívá elektroforetického transferu, kdy působením elektrického proudu se urychlí přenos proteinů na membránu. Jeho membrány jsou využívány membrány nitrocelulózy nebo polyvinylidenfluoridové (PVDF). Detekce proteinu na membráně probíhá pomocí vazby primární protilátky následovaná vazbou sekundární značené protilátky. Značkami na sekundární protilátce bývají enzymy (křenuv peroxidáza, alkalická fosfatáza) či jiná fluorescenční či chemiluminiscenční značka [271].

Při studiu autoprotiátěk touto metodou se sleduje, zda se určitá autoprotiátka ze séra váže na daný protein. Využívá se pouze úzkého proužku membrány, tzv. stripu, na kterém jsou rozseparovány či naneseny proteiny. Tento strip je inkubován s patientským sérem poté jsou navázané autoprotiátky detekovány značenými protilátkami. Takto lze učít specifitu autoprotiátěk. Ve studii skupiny Lambert (2006) využili western immunoblot pro určení afinity specifických protilátek proti A β oligomerům. A β oligomery jsou patologickými sestavami, které se akumulují v mozku pacientů s ACH. Také jsou antigenem pro tvorbu monoklonálních protilátek. Lambert a jeho kolektiv využitím této metody zjistili, že tyto protilátky rozpoznávají A β oligomery a fibrily, nikoliv však fyziologicky převládající A β monomery [98]. Studium vazebné specifity protilátek proti různým formám A β fragmentů je velice důležité pro porozumění přesné úlohy autoprotiátek vznikajících proti různým konformacím A β , kdy nejvíce antigenní jsou oligomery A β (1-42), a pro vývoj alternativní imunoterapie ACH.

Mikrofluidní technologie

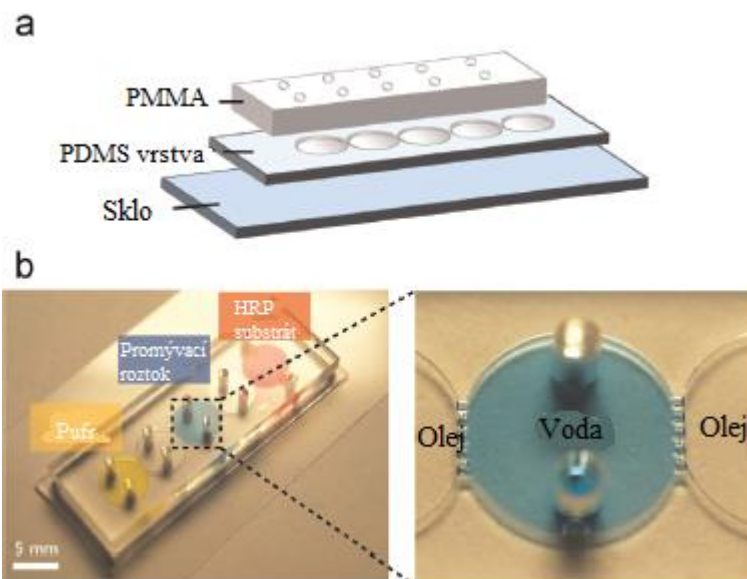
Mikrofluidní techniky umožnily miniaturizaci konvenční metody ELISA pro rozvoj point-of-care (POC) diagnostiky [231–233]. Výhody zařízení s proudovou mikroskopickou strukturou zahrnují jejich přenosnost, malé objemy vzorků a požadovaných činidel, jakož i sníženou pravděpodobnost kontaminace, nízkou cenu, nízkou spotřebu energie, a zvýšenou citlivost a spolehlivost [232, 234, 235].

Mikrofluidika je věda, která studuje chování tekutin pomocí mikro-kanálek a technologii výroby mikro-miniaturizovaných přístrojů obsahujících komory a tunely, přes které proudí tekutina. Alespoň jeden rozměr kanálu musí být v jednotkách mikrometru nebo desítek mikrometrů. Mikrofluidika se zabývá velmi malými objemy tekutin, a to až femtolitry, což je miliardtina litru (10^{-15}). Tekutiny se chovají velmi odlišně

v mikrometrickém měřítku oproti tomu makrometrickém, tedy tomu měřítku v každodenním životě. Tyto jedinečné rysy jsou klíčem k novým vědeckým experimentům a inovacím [258, 259].

Mikrofluidním čipem jsou zařízení s mikrokanálky. Sít' mikrokanálek je začleněna do čipu a propojena s makroprostředím několika otvory různých velikostí. Právě prostřednictvím těchto otvorů jsou tekutiny dávkovány i evakuovány do nebo z mikrofluidního čipu. Tekutiny jsou směřovány, míšeny, nebo jinak upraveny tak, aby se dosáhlo multiplexování, automatizace a vysoce výkonných systémů. Konstrukce sítě mikrokanálek musí být přesně zpracována pro dosažení požadovaných vlastností pro lab-on-a-chip, detekci patogenů, elektroforézu, analýzu DNA, a dalších [258].

Jsou vyvíjeny nové metody pro stanovení biomarkerů ACH. Právě jedním z nich je i mikrofluidní čip pro detekci oligomerního A β . Detekční systém tohoto oligomerního A β představil Kim *et al.*, 2015 ve své studii, kde popisuje jimi využitý mikrofluidní čip. Tento mikročip se skládá z komor obsahujících vodní nebo olejovou bázi pro souvislé měření. Mezi dvěma přiléhajícími komorami jsou mikropilíře, díky nimž vzniká silné rozhraní voda-olej. S pomocí těchto mikropilířů mají magnetické částice možnost kontinuálního průchodu přes každou komoru. Lineární pohyb magnetických částic je ovládán magnety táhnoucími se podél mikročipu (Obrázek 15). Tento čip měří 10 x 30 mm² a skládá se ze tří vrstev. Polydimethylsiloxanová (PDMS) vrstva obsahuje pět reakčních komor. Každá komora obsahuje kapaliny o objemu 7 ml. Mezi komorami jsou čtyři obdélníkové sloupky, které byly vytvořeny pro vytvoření robustní mezifázové bariéry. Tato platforma zjednodušuje komplikovaný postup metody ELISA a dosáhl vysoké citlivosti, která byla nejnižší ze všech konvenčních imunotestů využívajících magnetické částice [236].



Obrázek 15 Mikrofluidní platforma se mikro-pilířovou strukturou pro A β test: (A) schematický náčrt mikrofluidního zařízení v rozloženém stavu; (B) Fotografie sestaveného zařízení (vlevo) a pohled shora na zařízení pozorované mikroskopem (vpravo); měřítko 5 mm (upraveno dle [236]).

Multiplexní analýza autoprotilátek

Multiplexní analýza využívá velkokapacitních mikropolí, tzv. microarray, které mají na podložce fixované jednotlivé proteiny – antigeny. V poslední době je analýza autoprotilátek profilováním pomocí velkokapacitního mikropole čím dál více populární a je snaha vyvinout tuto diagnostiku i pro autoprotilátky vztahující se k onemocnění ACH. Tento přístup je označován jako "autoantibomika", paralelně s ostatními technologiemi s příponou "-omika". Použitím proteinových mikročipů, které obsahují tisíce unikátních lidských antigenů, se sondují séra od pacientů s ACH a zdravých kontrol. Nagele a jeho kolektiv popsali panel s 10 biomarkery proti autoprotilátkám, který by mohl pomoci odlišit pacienty s ACH od zdravých kontrol s vysokou citlivostí a specifíčností [237]. Kromě toho by tento panel mohl s vysokou přesností odlišit pacienty s ACH od pacientů s karcinomem prsu a Parkinsonovy choroby. Zajímavé je, že autoantigeny odpovídající těmto autoprotilátkám jsou vlastně proteiny, které nebyly dosud dostatečně charakterizovány a jejich role u onemocnění ACH nejsou jasné. Při použití techniky tohoto proteinového velkokapacitního mikropole, vyplynulo, že přirozené protilátky jsou v lidském séru hojné a všudypřítomné, a jejich hodnoty jsou ovlivněny věkem, pohlavím a stavem onemocnění [238]. Ačkoli technologie "autoantibomiky" slibuje velký pokrok jako diagnostický nástroj u ACH, dosavadní výsledky jsou předběžné [116].

3. Experimentální část

3.1. Přístroje a pomůcky

- fotometr pro mikrotitrační destičky Multiskan RC, type 351 (Labsystems, Helsinky, Finsko)
- skenovací elektronový mikroskop JEOL 5600LV (JEOL Ltd., Tokio, Japonsko)
- analyzátor potenciálu ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY, USA)
- pH metr model Orion 420A plus (Orion Research Inc., Beverly, MA, USA)
- magnetický separátor Dynal MPC-S (Dynal, Carlsbad, CA, USA)
- magnetický separátor na mikrotitrační destičky MagnetoPURE 96 (Chemicell, Berlín, Německo)
- rotátor Bio RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- aparatura pro diskontinuální elektroforézu Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, Hercules, CA USA)
- zdroj napětí Power Pac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- mikrostříkačka Hamilton - 50, 100 µl (Hamilton AG, Bonaduz, Švýcarsko)
- multifunkční třepačka Orbital Shaker PSU-20i (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- magnetické míchadlo MM4 (LAVAT a.s. Chotutice, Radim u Kolína, ČR)
- topné hnízdo Block heater Grant Bio BTD (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- třepačka Minishaker MS 2 (IKA® Werke GmbH & CO.KG, Staufen, Německo)
- třepačka na mikrotitrační destičky Grant Bio PMS 1000 Microplate Shaker (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- termostat Biological Thermostat BT 120 M (Laboratorní přístroje Praha, Praha, ČR)
- mikrotitrační destičky – typ P, 96 jamek, polystyrenové (GAMA GROUP a.s., České Budějovice, ČR)
- mikrozkuřavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- parafilm M® Laboratory Film (Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA)

3.2. Charakterizace a příprava magnetického nosiče

3.2.1. Charakteristika vybraných magnetických částic

Použité částice:

- SiMAG-Amine (Chemicell, Berlín, Německo, průměr: 1 μm)
- SiMAG-Carboxyl (Chemicell, Berlín, Německo, průměr: 1 μm)
- ProMAG-Carboxyl (Bangs Laboratories, Indiana, USA, průměr: 0,8 μm)
- Dynabeads M-270 Amine (Invitrogen Dynal, Carlsbad, CA, USA, průměr: 2,8 μm)
- Micromer-M, NH₂ (Micromod, Rostock, Německo, průměr: 3 μm)

3.2.2. Charakterizace magnetických částic pomocí skenovací elektronové mikroskopie

Použité roztoky a reagensy:

- Voda upravená DEPC
- Magnetické částice (uvedeny v podkap. 3.2.1.)

Postup:

1 mg magnetických částic byl 3x promyt 1 ml vodou upravenou DEPC a poté byl ponechán v malém množství vody (zhruba 20 μl). Na Petriho misku bylo napipetováno 10 μl suspenze částic. Částice byly usušeny buď za laboratorní teploty, nebo při 37 °C po dobu nejméně jednoho dne. Poté byly za pomoci špachtle přeneseny do mikroskopické desky, a ještě se hodinu sušily při 37 °C. Suché částice byly uzavřeny v mikroskopické desce a utěsněny parafilmem. Takto připravené částice bez povrchové úpravy byly pozorovány na terčičku na SEM JEOL 5600LV, CEMNAT. Zvětšení bylo v rozsahu 1 000 až 100 000krát.

3.2.3. Charakterizace magnetických částic pomocí dynamického rozptylu světla

Použité roztoky a reagensy:

- Magnetické částice (uvedeny v podkap. 3.2.1.)
- Destilovaná voda

Postup:

0,1 mg magnetických částic byl 3x promyt a poté resuspendováno v 1,5 ml destilované vody. Měření bylo prováděno při 20 °C, s úhlem rozptylu 173 °. Každé měření bylo provedeno po 10 opakováních po 30 sekundách. Výsledná data byla zpracována statisticky.

3.2.4. Měření zeta-potenciálu u magnetických částic

Použité roztoky a reagensy:

- Magnetické částice (uvedeny v podkap. 3.2.1.)
- 0,01 M PBS pufr pH 7,4

Postup:

Magnetické částice byly 2x promyty v 0,01 M PBS pufru pH 7,4 a do měrné kyvety bylo aplikováno 0,1 mg částic v celkovém objemu 1,5 ml pufru. Takto připravené vzorky byly změřeny pomocí potenciálového analyzátoru ZetaPALS, UECHI. Každé měření zahrnuje alespoň 6 cyklů s 10 jednotnými měřeními a několika kroků míchání, aby se zabránilo usazování magnetických částic. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány a byla vypočtena standardní odchylka (SD).

3.2.5. Imobilizace α -chymotrypsinu na magnetický nosič

Použité chemikálie a reagenty:

- α -chymotrypsin (EC 3.4.21.1, 83,9 IU/mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Magnetické částice (uvedeny v podkap. 3.2.1.)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDAC, $C_8H_{17}N_3$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (Sulfo-NHS, $C_4H_4NNaO_6S$) (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- 2-(N-Morfolin-4-yl)ethansulfonová kyselina (MES, $C_6H_{13}NO_4S$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Amine-Poly (ethyleneglycol) – carboxymethyl (NH_2 -PEG-CM) (Laysan Bio, Inc., Arab, AL, USA).
- Základní chemikálie čistoty p.a. (Penta s.r.o., Praha, ČR; Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Promývací roztok 1: 0,1 M MES pH 5
 - Promývací roztok 2: 0,1 M MES pH 5 s 1 M NaCl
 - Vazebný roztok: 0,01 M MES pH 5
 - Skladovací roztok: 0,1 M PBS pufr pH 7,4
-
- **2-kroková karbodiimidová imobilizace α -chymotrypsinu s následnou imobilizací PEGu na karboxylové magnetické částice**

Postup:

Uvedený postup je pro přípravu 1 mg magnetických částic.

Magnetické částice byly 4x promyty v 1 ml 0,1 M MES pH 5. K alikvotu promytých částic byl přidán EDAC o koncentraci 0,0391 mol/l v 0,01 M MES pH 5 a Sulfo-NHS o koncentraci $5,76 \cdot 10^{-3}$ mol/l v 0,01 M MES pH 5. Následovala inkubace 10 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl odstraněn supernatant a k částicím bylo přidáno 100 μ g/mg částic α -chymotrypsinu v 1 ml 0,01 M MES pH 5. Následovala inkubace přes noc při 4 °C na rotátoru. Po inkubaci byl odstraněn supernatant a k částicím byly přidány

3,4 mg/mg částic NH₂-PEG-CM v 1,9 ml 0,01 M MES pH 5. Následovala inkubace 1 hodinu při 4 °C na rotátoru. Po inkubaci byly částice promyty: nejprve 5 x 1 ml 0,1 M MES pH 5, poté jednou 1 ml 0,1 M MES pH 5 s 1 M NaCl, a nakonec 4 x 1 ml 0,1 M MES pH 5. Pokud se následně nespotřebovaly všechny magnetické částice, byly uskladněny ve skladovacím roztoku při 4 °C.

- **1-kroková karbodiimidová imobilizace α -chymotrypsinu s následnou imobilizací PEGu na aminové magnetické částice**

Postup:

Uvedený postup je pro přípravu 1 mg magnetických částic.

Magnetické částice byly 4x promyty v 1 ml 0,1 M MES pH 5. K alikvotu promytých částic byl přidán EDAC o koncentraci 0,0391 mol/l v 0,01 M MES pH 5 a Sulfo-NHS o koncentraci $5,76 \cdot 10^{-3}$ mol/l v 0,01 M MES pH 5, 100 μ g/mg částic α -chymotrypsinu v celkovém reakčním objemu 1 ml. Následovala inkubace přes noc při 4 °C na rotátoru. Po inkubaci byl odstraněn supernatant a k částicím byly přidány 3,4 mg/mg částic NH₂-PEG-CM v 1,9 ml 0,01 M MES pH 5. Následovala inkubace 1 hodinu při 4 °C na rotátoru. Po inkubaci byly částice promyty: nejprve 5x 1 ml 0,1 M MES pH 5, poté jednou 1 ml 0,1 M MES pH 5 s 1 M NaCl, a nakonec 4x 1 ml 0,1 M MES pH 5. Pokud se následně nespotřebovaly všechny magnetické částice, byly uskladněny ve skladovacím roztoku při 4 °C.

3.2.6. Imobilizace A β na magnetický nosič

Použité chemikálie a reagenty:

- Peptid A β (1-42) (koncentrace 1 mg/ml 0,16 % NH₄OH; čistota \geq 95 %; Apronex s.r.o., Vestec, ČR)
- Magnetické částice ProMAG-Carboxyl (Bangs Laboratories, Indiana, USA, průměr: 0,8 μ m)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDAC, C₈H₁₇N₃) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- N-hydroxysulfosukcinimid sodný (Sulfo-NHS, $C_4H_4NNaO_6S$) (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- 2-(N-Morfolin-4-yl)ethansulfonová kyselina (MES, $C_6H_{13}NO_4S$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Amine-Poly (ethyleneglycol) – carboxymethyl (NH_2 -PEG-CM) (Laysan Bio, Inc., Arab, AL, USA).
- Poly(ethylene glycol) bis(3-aminopropyl) terminated (NH_2 -PEG- NH_2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Základní chemikálie čistoty p.a. (Penta s.r.o., Praha, ČR; Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Vazebný roztok: 0,1 M MES pH 4,5
- Vazebný roztok 2 (pro NH_2 -PEG- NH_2 nebo NH_2 -PEG-CM): 0,01 M MES pH 4,5
- Promývací a skladovací roztok: 0,1 M PBS pufr pH 7,4

○ **2-kroková karbodiimidová imobilizace A β na karboxylové magnetické částice**

Postup:

Uvedený postup je pro přípravu 1 mg magnetických částic.

Magnetické částice byly 4x promyty v 1 ml 0,1 M MES pH 4,5. K alikvotu promytých částic byl přidán EDAC o koncentraci 0,0391 mol/l v 0,01 M MES pH 4,5 a Sulfo-NHS o koncentraci $5,76 \cdot 10^{-3}$ mol/l v 0,01 M MES pH 4,5. Následovala inkubace 10 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Supernatant byl odstraněn a částice byly jednou promyty 0,1 M MES pH 4,5. K částicím bylo přidáno 50 μ g/mg částic A β (1-42) v celkovém reakčním objemu 1 ml. Následovala inkubace přes noc při 4 °C na rotátoru. Poté byly částice zablokovány buďto 1 % BSA 1 hodinu na rotátoru při laboratorní teplotě, nebo pomocí 3,4 mg/mg částic NH_2 -PEG-CM v 1,9 ml 0,01 M MES pH 4,5 1 hodinu při 4 °C na rotátoru. Po inkubaci byly částice promyty 10x v 1 ml PBS pufru pH 7,4. Pokud se následně nespotřebovaly všechny magnetické částice, byly uskladněny ve skladovacím roztoku při 4 °C.

○ **imobilizace A β přes „raménko“ na karboxylové magnetické částice**

Postup:

Uvedený postup je pro přípravu 1 mg magnetických částic.

Magnetické částice byly 4x promyty v 1 ml 0,1 M MES pH 4,5. K alikvotu promytých částic byl přidán EDAC o koncentraci 0,0391 mol/l v 0,01 M MES pH 4,5 a Sulfo-NHS o koncentraci $5,76 \cdot 10^{-3}$ mol/l v 0,01 M MES pH 4,5. Následovala inkubace 10 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Supernatant s přebytkem činidel byl odstraněn a k částicím bylo přidáno 0,003 mg NH₂-PEG-NH₂/mg částic v 1 ml 0,01 M MES pH 4,5. Tato reakční směs se inkubovala přes noc při 4 °C na rotátoru. Po inkubaci byly částice promyty nejprve 7x 1 ml 0,1 M MES pH 4,5, poté jednou 1 ml 0,1 M MES pH 4,5 s 1 M NaCl, a nakonec 2x 1 ml 0,1 M MES pH 4,5. K alikvotu promytých částic byl přidán EDAC o koncentraci 0,0391 mol/l v 0,1 M MES pH 4,5 a Sulfo-NHS o koncentraci $5,76 \cdot 10^{-3}$ mol/l v 0,1 M MES pH 4,5, a 50 μ g A β (1-42) v celkovém reakčním objemu 1 ml. Následovala inkubace přes noc při 4 °C na rotátoru. Poté byly částice zablokovány buďto 1 % BSA 1 hodinu na rotátoru při laboratorní teplotě, nebo pomocí 3,4 mg NH₂-PEG-CM v 1,9 ml 0,01 M MES pH 4,5 1 hodinu při 4 °C na rotátoru. Po inkubaci byly částice promyty 10x v 1 ml PBS pufru pH 7,4. Pokud se následně nespotřebovaly všechny magnetické částice, byly uskladněny ve skladovacím roztoku při 4 °C.

3.2.7. Stanovení aktivity imobilizovaného α -chymotrypsinu

Použité chemikálie a reagensy:

- Magnetické částice s imobilizovaným α -chymotrypsinem
- Zásobní roztok α -chymotrypsinu (1 mg/ml ředícího roztoku)
- N-Sukcinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid (SUPHEPA, C₁₉H₁₉N₃O₆) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (C₄H₁₁NO₃) (Penta s.r.o., Praha, ČR)
- Základní chemikálie čistoty p.a. (Penta s.r.o., Praha, ČR; Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Substrátový roztok: 0,026 M SUPHEPA v N,N-dimethylformamidu (skladovat v chladničce, ve skleněné zkumavce, chránit před světlem)

- Promývací a ředící roztok: 0,1 M Tris-HCl pufr pH 7,8 s 0,025 M CaCl₂
- Zastavovací roztok: 30 % kyselina octová

○ **Stanovení aktivity imobilizovaného enzymu**

Od částic s imobilizovaným α -chymotrypsinem (viz. kap. 3.2.5.) bylo odebráno množství 0,3 mg částic v dubletu. Byl odstraněn supernatant a částice následně resuspendovány v 0,1 ml 0,1 M Tris-HCl pufru pH 7,8 s 0,025 M CaCl₂. K 0,1 ml vzorku bylo přidáno 1,25 ml 0,1 M Tris-HCl pufru pH 7,8 s 0,025 M CaCl₂ a tato směs byla temperována 30 minut při 37 °C na rotátoru. Poté bylo ke směsi přidáno 0,1 ml substrátového roztoku a následovala inkubace 30 minut při 37 °C na rotátoru. Po inkubaci bylo přidáno 0,2 ml 30 % kyseliny octové, čímž byla reakce zastavena. Do destičky bylo z této reakční směsi pipetováno 200 μ l a absorbance byla měřena při 405 nm.

○ **Stanovení aktivity solubilního enzymu – kalibrační řada**

Výše popsaným postupem byly proměřeny vzorky kalibrační řady solubilního α -chymotrypsinu.

Zásobní roztok α -chymotrypsinu byl připraven rozpuštěním 1 mg enzymu v 1 ml ředícího roztoku a z něj byly dále připraveny jednotlivé kalibrační roztoky podle tabulky 5. Naměřené hodnoty absorbance poté byly použity k sestavení kalibrační křivky vyjadřující závislost absorbance na koncentraci enzymu, která byla použita pro výpočet množství imobilizovaného enzymu na magnetických částicích.

Tabulka 2 Příprava kalibrační řady α -chymotrypsinu pro stanovení aktivity pomocí nízkomolekulárního substrátu SUPHEPA.

c (α -CHT) [μ g/100 μ l]	V (zás. roztoku α -CHT) [μ l]	V (ředícího roztoku) [μ l]
5	5	95
10	10	90
25	25	75
50	50	50
75	75	25
100	100	-
Slepý vzorek	-	100

3.2.8. Stanovení množství proteinu pomocí BCA testu

Použité roztoky, chemikálie a reagensie:

- součástí kitu: MicroBCA™ Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)
- Roztok A: uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný avinan sodný v 0,2 M NaOH
- Roztok B: 4 % 2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylová kyselina (BCA) v destilované vodě
- Roztok C: 4 % pentahydrát síranu měďnatého v destilované vodě
- Magnetické částice s imobilizovaným proteinem
- Zásobní roztok proteinu – α -chymotrypsin (1 mg/ml redestilované vody), A β (1-42) peptid (1 mg/ml v PBS pufru pH 7,4)
- Redestilovaná voda, 0,01 M MES pH 5 (pro α -chymotrypsin) nebo PBS pufr 7,4 (pro A β (1-42))

Postup:

Roztoky A, B a C byly smíchány v poměru 25 : 24 : 1. Bylo odebráno množství suspenze částic s navázaným enzymem odpovídajícímu 0,1 mg částic v dubletu. Supernatant byl odtáhnut a částice znovu resuspendovány ve 150 μ l 0,01 M MES pH 5 nebo PBS pufru 7,4. K této suspenzi bylo přidáno 150 μ l směsi roztoků A, B a C. Směs byla inkubována 2 hodiny při 37 °C za mírného otáčení. Poté byla ve 300 μ l pipetovaných do destičky změřena absorbance supernatantu při 570 nm.

Stejným způsobem byly připraveny a proměřeny i slepé vzorky. Výše popsaným postupem byla proměřena i kalibrační řada solubilního proteinu. Příprava jednotlivých kalibračních roztoků je shrnuta v tabulce 3 nebo 4. Kalibrační roztok byl napipetován do jamky mikrotitrační destičky v objemu 150 μ l. K tomuto roztoku byla přidána směs roztoků A, B a C o objemu 150 μ l. Po inkubaci 2 hodin při 37 °C byla destička proměřena při 570 nm. Naměřené hodnoty byly poté použity k sestavení kalibrační křivky vyjadřující závislost absorbance na koncentraci solubilního proteinu, podle které bylo vypočítáno množství daného proteinu imobilizovaného na magnetických částicích.

Tabulka 3 Příprava kalibrační řady solubilního proteinu α -chymotrypsinu pro kvantifikaci BCA testem.

Zkumavka	Množství destilované vody [μ l]	Množství a zdroj roztoku α -CHT [μ l]	Výsledná koncentrace α -CHT [μ g/ml]
1	900	100 (ze zásobního roztoku)	200
2	800	200 ze zkumavky č. 1	40
3	400	400 ze zkumavky č. 2	20
4	400	400 ze zkumavky č. 3	10
5	400	400 ze zkumavky č. 4	5
6	400	400 ze zkumavky č. 5	2,5
7	480	320 ze zkumavky č. 6	1
8	400	400 ze zkumavky č. 7	0,5
Slepý vzorek	1000	0	0

Tabulka 4 Příprava kalibrační řady solubilního peptidu A β (1-42) pro kvantifikaci BCA testem.

Zkumavka	Množství PBS pufru pH 7,4 [μ l]	Množství a zdroj roztoku A β [μ l]	Výsledná koncentrace A β [μ g/ml]
1	360	40 (ze zásobního roztoku A β)	200
2	300	200 ze zkumavky č. 1	40
3	250	250 ze zkumavky č. 2	20
4	250	250 ze zkumavky č. 3	10
5	250	250 ze zkumavky č. 4	5
6	250	250 ze zkumavky č. 5	2,5
7	180	120 ze zkumavky č. 6	1
8	100	100 ze zkumavky č. 7	0,5
Slepý vzorek	200	0	0

3.2.9. Tricin-SDS-PAGE elektroforéza

Potřebné chemikálie a reagensy:

- Akrylamid (C_3H_5NO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N'-metylen-bis-akrylamid ($C_7H_{10}N_2O_2$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris-(hydroxymethy)-aminomethan ($C_4H_{11}NO_3$) (Penta s.r.o., Praha, ČR)
- SDS (sodiumdodecylsulfát), p.a. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin, $C_6H_{16}N_2$)
- Základní chemikálie čistoty p.a. (Penta s.r.o., Praha, ČR; Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Roztoky:

- Roztok A1 – 49,5 % T, 6 % C – 46,5 % (w/v) akrylamid a 3 % (w/v) bisakrylamid
- Roztok A2 – 49,5 % T, 3 % C – 48 % (w/v) akrylamid a 1,5 % (w/v) bisakrylamid
- Roztok B – 3 M Tris-HCl pufr pH 8,45 s 0,3 % SDS (gelový pufr)
- Roztok C – 10 % roztok persíranu amonného
- Roztok D – TEMED
- Pufr pro vzorky – Tricin vzorkový pufr
- Elektrodotový pufr – 0,1 M Tris; 0,1 M Tricin; 0,1 % SDS
- Polypeptidový marker (Bio-Rad, Herkules, CA, USA)

Postup:

- Dělicí gel

Ve zkumavce odpovídajícího objemu byla postupně smíchána urea, destilovaná voda, roztoky A2, B a TEMED, poté byl přidán roztok D (Tabulka 4). Směs byla promíchána a ihned aplikována mezi skla. Gel byl převrstven destilovanou vodou a ponechán minimálně 30 minut tuhnout.

- Zaostrovací gel

Ve zkumavce odpovídajícího objemu byla postupně smíchána urea, destilovaná voda, roztoky A2, B a TEMED (Tabulka 5). Přebytečná voda byla od ztuhlého gelu odsáta pomocí filtračního papíru. Do připravené směsi byl přidán roztok D (Tabulka 5) a tato směs po promíchání byla ihned aplikována mezi skla, následně byl vložen do ještě tekuté směsi „hřebínek“. Zaostrovací gel byl minimálně 20 – 30 minut tuhnul.

- Příprava vzorků

Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 1 : 1 nebo 1 : 2. Vzorky byly povařeny 3 minuty, a poté byly nadávkovány. Marker byl připravován přidáním 1 μ l polypeptidového markeru k 19 μ l vzorkového pufru, a směs byla povařena 3 minuty.

- Nastavení zdroje

Pro zatažení vzorků do zaostřovacího gelu byl gel vystaven na 30 minut napětí 30 V při proudu 0,06 A. Samotná separace probáhala 1 až 2 hodiny při napětí 100 V a proudu 0,06 A, přičemž celá aparatura byla po celou dobu chlazená v lednici.

Tabulka 5 Příprava jednotlivých gelů pro Tricin-SDS-PAGE elektroforézu.

	Dělicí gel (Mr 1 – 70 kDa) (16,5 %T, 3 %C)	5 % zaostřovací gel
Močovina	2,4 g	0,9 g
Destilovaná voda	1,666 ml	2,1 ml
Roztok A1	-	-
Roztok A2	1,666 ml	0,25 ml
Roztok B	1,666 ml	0,775 ml
Roztok D	0,0025 ml	0,0025 ml
Roztok C	0,025 ml	0,025 ml

3.2.10. Vizualizace proteinů/peptidů v PAGE pomocí dusičnanu stříbrného

Použité chemikálie:

- Glutaraldehyd 50 % nebo 25 % roztok (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina octová 99 % (Penta s.r.o., Chrudim, ČR)
- Ethanol (Penta s.r.o., Chrudim, ČR)
- Amoniak vodný roztok 26 % (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)
- Hydroxid sodný (Penta s.r.o., Chrudim, ČR)
- Dusičnan stříbrný (AgNO_3) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina citronová bezvodá (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Formaldehyd 36–38 % vodný roztok (Penta s.r.o., Chrudim, ČR)

- Destilovaná voda

Použité roztoky:

- Fixační roztok: 5 % kyselina octová + 50 % ethanol
- Vyvolávací roztok: 0,05 % kyselina citronová + 0,04 % formaldehyd
- Ustalovací roztok: 5 % kyselina octová
- Roztok amoniakálního stříbra: 20 % roztok AgNO_3 je postupně přikapáván (titrován) k roztoku o složení – 21 ml destilované vody + 1,4 ml vodného roztoku amoniaku + 239 μl 9 M NaOH – až do vzniku světle béžovo–hnědého zákalu. Poté je roztok doplněn na 100 ml destilovanou vodou (vystačí na 3–4 gely).

Postup:

Po elektroforetické separaci byl gel vyjmut z aparatury a propláchnut destilovanou vodou. Poté následovala jeho fixace přes noc při 4 °C, případně byla tato doba zkrácena na cca 1 hodinu. Druhý den po fixaci následovala rehydratace gelu v destilované vodě po dobu 30 min (RT, třepačka). Následně byl gel inkubován 30 min s 10 % glutaraldehydem. Promývání gelu bylo 6x opakováno po 10 min destilovanou vodou. Dále byl gel inkubován 12–15 min s roztokem amoniakálního stříbra, poté byl rychle opláchnut v destilované vodě a byl aplikován vyvolávací roztok. Vyvolávací roztok byl za mírného třepání nechán působit, dokud se na gelu nezobrazily proužky vzorků a markerů o požadované intenzitě. Vyvolávání bylo ukončeno slitím roztoku a přidáním ustalovacího roztoku, ve kterém bylo možné gel skladovat při 4 °C.

3.2.11. Enzymová imunoanalýza s využitím magnetických částic

Použité chemikálie a reagensy:

a) α -chymotrypsinový systém

Pozitivní prasečí sérum: Hyperimunní prasečí sérum s polyklonálními anti-chymotrypsinovými protilátkami, ředěné 1:15 000 (Sevac, Praha, CZ)

Sekundární protilátka (tzv. konjugát): králičí protilátky proti prasečím IgG (celé molekule) značené HRP, afinitně izolované, ředěné 1:8 000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

b) *Systém A β*

Pacienstká a kontrolní séra: ředěná 1:100 (AD centrum, Praha)

Sekundární protilátka (tzv. konjugát): kozí protilátky proti lidským IgG, značené HRP, IgG frakce antiséra, ředěné 1:8000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Magnetické částice s imobilizovaným ligandem
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)
- Hovězí sérový albumin, frakce V (BSA, ≥ 96 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Základní chemikálie čistoty p.a. (Penta s.r.o., Praha, ČR; Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- PBS pufr pH 7,4
- Uhličitanový pufr pH 7,4
- Ředící roztok pro vzorky (0,1 % BSA v PBST): PBS pH 7,4, 0,05 % Tween 20, 0,1 % BSA
- Promývací roztok: PBS pH 7,4, 0,05 % Tween 20, 5 % BSA
- Ředění roztok pro konjugát-HRP: Uhličitanový pufr pH 9,49, 0,05 % Tween 20, 0,1 % BSA
- Substrátový roztok: 0,1 M octanový pufr pH 5,5, 0,3 mM roztok TMB (6 mg TMB / ml DMSO), 0,03 % H₂O₂
- Zastavovací roztok: 1 M H₂SO₄

Postup:

Pokud byly částice déle uskladňovány a nechávány v PBS pufru, musely být několikrát promyty PBS pufrem. Poté byly částice 3x promyty v 0,1 % BSA v PBST. Do jamky bylo aplikováno množství magnetických částic odpovídající 0,05 mg. Částice byly separovány na magnetickém separátoru a supernatant byl odstraněn. Bylo přidáno po 100 μ l ředěné sérum, inkubace 45 minut při 37 °C na třepačce. Po inkubaci sér byly částice separovány na magnetickém separátoru a byl odstraněn supernatant. Částice byly 3x promyty po 150 μ l promývacím roztokem. Poté byla aplikována po 100 μ l sekundární protilátka,

inkubace 45 minut při 37 °C na třepačce. Destička byla promyta 3x po 150 µl promývacím roztokem a 2x po 150 µl PBS pufrem pH 7,4. Byl napipetován substrát po 100 µl, inkubace 10 minut při laboratorní teplotě na třepačce a ve tmě. Reakce byla zastavena přidáním 50 µl 1 M H₂SO₄ a barevné změny byly měřeny při 450 nm po odseparování částic.

3.2.12. Enzymová imunoanalýza v mikrotitrační destičce – Aβ systém

Použité chemikálie a reagenty:

- Peptid Aβ (1-42) (koncentrace 1 mg/ml 0,16 % NH₄OH; čistota ≥ 95 %; Apronex s.r.o., Vestec, ČR)
- Pacienstská a kontrolní séra: ředěná 1:100 (AD centrum, Praha)
- Sekundární protilátka (tzv. konjugát): kozí protilátky proti lidským IgG, značené HRP, IgG frakce antiséra, ředěné 1:8000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)
- Hovězí sérový albumin, frakce V (BSA, ≥ 96 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Základní chemikálie čistoty p.a. (Penta s.r.o., Praha, ČR; Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- PBS pufr pH 7,4
- Uhličitanový pufr pH 7,4
- Ředící roztok pro vzorky (0,1 % BSA v PBST): PBS pH 7,4, 0,05 % Tween 20, 0,1 % BSA
- Promývací roztok: PBS pH 7,4, 0,05 % Tween 20, 5 % BSA
- Ředění roztok pro konjugát-HRP: Uhličitanový pufr pH 9,49, 0,05 % Tween 20, 0,1 % BSA
- Substrátový roztok: 0,1 M octanový pufr pH 5,5, 0,3 mM roztok TMB (6 mg TMB / ml DMSO), 0,03 % H₂O₂
- Zastavovací roztok: 1 M H₂SO₄

Postup:

Aktivace destičky proběhla pomocí 2,5 % glutaraldehydu v uhličitanovém pufru pH 9,49. Roztok glutaraldehydu byl pipetován ve 150 μ l na jamku, inkubován 2 hodiny při laboratorní teplotě a poté vyklepnut. Následovala aplikace A β (1-42) v PBS pufru pH 7,4, kdy ve 150 μ l byly 2 μ g tohoto peptidu. Takto připravená mikrodestička byla inkubována přes noc při 4 °C. Po inkubaci byly jamky 3x po 150 μ l promyty PBS pufrem pH 7,4. Poté bylo přidáno po 100 μ l ředěné lidské sérum, inkubace 45 minut při 37 °C na třepačce. Po inkubaci byla destička 3x promyta po 150 μ l promývacím roztokem. Poté byla aplikována po 100 μ l sekundární protilátka ředěná 1:8000, inkubace 45 minut při 37 °C na třepačce. Destička byla promyta 3x po 150 μ l promývacím roztokem a 2x po 150 μ l PBS pufrem pH 7,4. Poté byl napipetován substrát po 100 μ l, inkubace 10 minut při laboratorní teplotě na třepačce a ve tmě. Reakce byla zastavena přidáním 50 μ l 1 M H₂SO₄ a barevné změny byly měřeny při 450 nm.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Výběr magnetického nosiče pro metodu MELISA

Magnetické částice pro metodu MELISA musí splňovat určitá kritéria. Těmi jsou především, co nejvyšší vazebná kapacita a minimální agregace částic jak čistých, tak modifikovaných nejrůznějšími ligandy. Částice by měly být monodisperzní, aby se zajistily jednotné fyzikální, chemické a biomedicínské vlastnosti. Dále by neměly sorbovat na povrch mikrotitrační destičky nebo na další materiály používané při manipulaci s nimi [239, 240]. Proto bylo využito hned několika hledisek, podle kterých byl vybírán nejvhodnější magnetický nosič pro stanovení anti-A β (1-42) autoprotilátek metodou MELISA. Byla sledována velikost částic pomocí dynamického rozptylu světla a skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Pomocí SEM byla hodnocena ještě tendence magnetických částic agregovat. Dále byla sledována a hodnocena účinnost vazby modelového proteinu, a chování částic v během jednotlivých kroků metody MELISA.

Při výběru vhodného magnetického nosiče byl použit modelový systém antigenu a specifické protilátky. Antigenem byl hovězí α -chymotrypsin a anti-chymotrypsinové protilátky z hyperimunního prasečího séra. Modelový systém byl využit především z ekonomického hlediska. Metody a postupy pro imobilizaci α -chymotrypsinu a A β peptidu na magnetické částice navazovaly na postupy předchozí diplomové práce [241]. Pro imobilizaci obou ligandů byly vybrány magnetické částice s funkční aminovou skupinou. Ligandy, a pak především A β (1-42) peptidy, jsou tak imobilizovány přes C-konec. Je to výhodné proto, že anti-A β protilátky ze séra jsou cílené proti aminokyselinám vyskytujících se na N-konci A β peptidu [156] a ten je v okamžiku vazby k nosiči stéricky přístupný pro vazbu protilátky. Pro vazbu ligandu byla využita karbodiimidová metoda, při níž dochází k aktivaci karboxylové skupiny proteinu/peptidu, které posléze reagují s primárními aminy nosiče za vzniku amidové vazby [242, 260, 261].

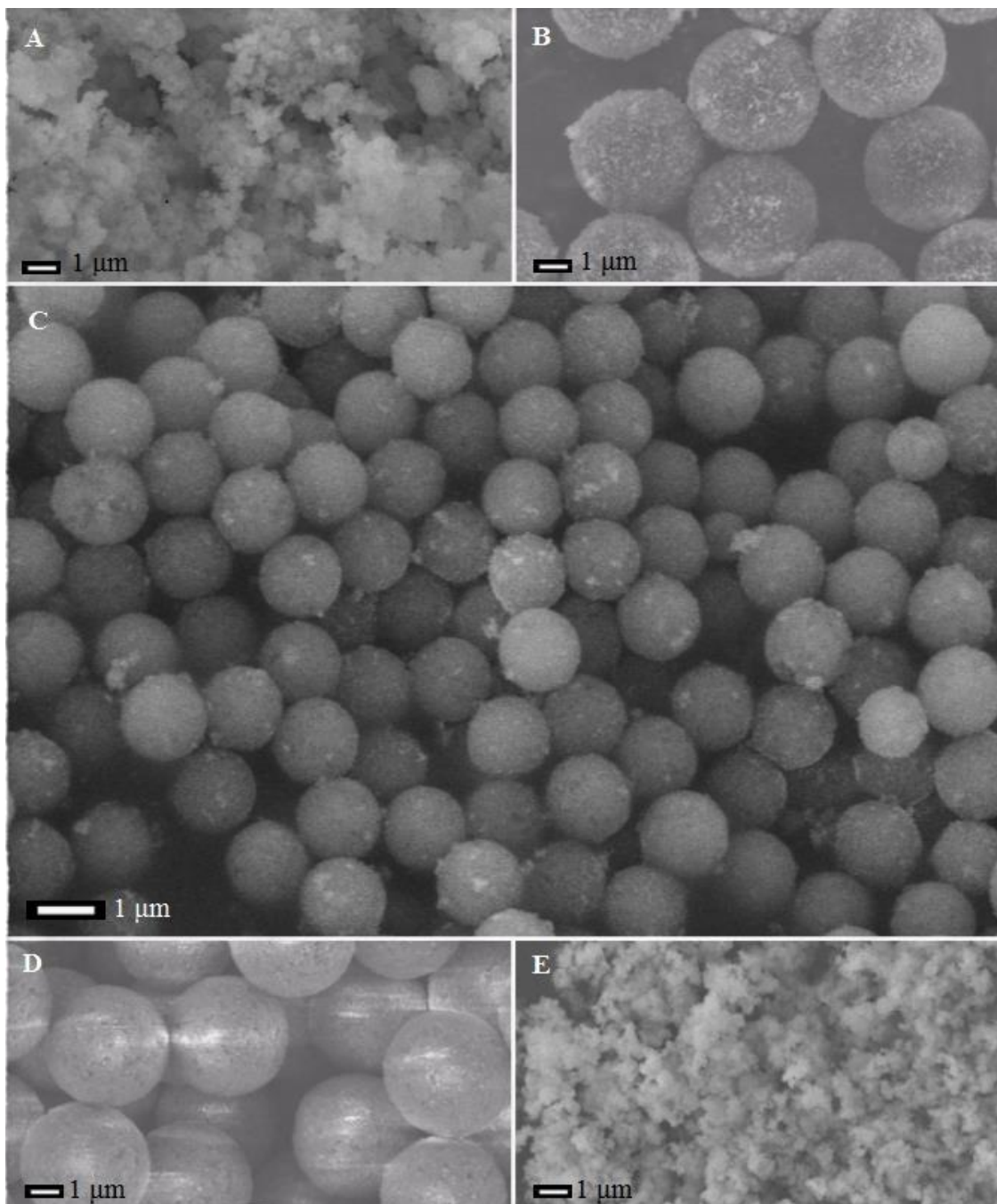
V této práci ale byly použity také magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou, u kterých byla před vazbou ligandu provedena změna jejich karboxylové funkční skupiny na aminovou [243]. Použité karboxylové částice obsahovaly vyšší počet funkčních skupin na svém povrchu než aminové částice. Přehled všech použitých magnetických částic a jejich charakteristik je uveden v tabulce 6.

Tabulka 6 Charakteristika magnetických částic.

Název	Výrobce	Velikost částic	Funkční skupina	Polymer	Počet funkčních skupin na povrchu	Hustota částic [g/cm ³]	Počet částic
SiMAG-Amine	Chemicell	1 μm	-NH ₂	oxid křemičitý	~ 350 μmol/g	~ 2,25	~ 1,8 x 10 ¹² /g
SiMAG-Carboxyl	Chemicell	1 μm	-COOH	oxid křemičitý	~ 850 μmol/g	~ 2,25	~ 1,8 x 10 ¹² /g
ProMAG-Carboxyl	Bangs Laboratories	0,8 μm	-COOH	výrobce nevedeno	výrobce nevedeno	~ 1,8	~ 2,1 x 10 ¹² /g
Micromer-M NH₂	Micromod	3 μm	-NH ₂	polystyren	výrobce nevedeno	~ 1,1	~ 6,4 x 10 ¹⁰ /g
Dynabeads M-270 Amine	Invitrogen Dynal	2,8 μm	-NH ₂	výrobce nevedeno	~ 100 - 200 μmol/g	výrobce nevedeno	~ 7 x 10 ¹⁰ /g

4.2. Charakterizace magnetických částic pomocí skenovací elektronové mikroskopie a dynamického rozptylu světla

Magnetické částice byly morfologicky hodnoceny pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. A to především pro sledování velikosti, tvaru a charakteru u námi vybraných magnetických částic (přehled viz Tabulka 6). Pro charakterizaci magnetických částic skenovacím elektronovým mikroskopem byly připraveny všechny částice podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.2.



Obrázek 16 SEM snímky magnetických částic. A - SiMAG-Amine, B – Micromer-M NH₂, C - ProMAG-Carboxyl, D – Dynabeads M-270 Amine, E – SiMAG-Carboxyl.

Snímky magnetických částic ze SEM jsou uvedeny na obrázku 16 a v přílohách A - E. U částic ProMAG-Carboxyl výrobce uvádí velikost 0,8 μm. Tato velikost byla potvrzena i během našeho pozorování pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Další sledovaný parametr byl pravidelný sférický tvar těchto částic, nedocházelo k jejich rozpadu a degradaci, a nebyla pozorována jejich agregace (Obrázek 16C). U částic SiMAG-Amine (Obrázek 16A) a SiMAG-Carboxyl (Obrázek 16E) výrobce uvádí velikost 1 μm naměřenou metodou

dynamického rozptylu světla (DLS). Na snímcích ze SEM bylo více jak 90 % těchto částic nekompaktních, a jen u zlomku z nich byl pozorován sférický tvar. Výrobce těchto magnetických částic udává, že částice se skládají z magnetického jádra a ve dvojnásobku průměru jádra je na povrchu hydrofobní matrice [268]. To může být důvodem proč byly tyto sférické částice na snímcích ze SEM tak malé a se spoustou nekompaktního materiálu. U částic Micromer-M NH₂ (Obrázek 16B) byl pozorován hrubší a pórovitější povrch oproti částicím Dynabeads M-270 Amine (Obrázek 16D). U těchto částic byl pozorován sférický tvar a byla ověřena jejich velikost udávaná výrobcem.

Dále byla pro charakterizaci hydrodynamické velikosti využita metoda dynamického rozptylu světla. Při přípravě magnetických částic pro skenovací elektronovou mikroskopii se částice suší a tím ztrácí hydratační obal. Naopak při měření DLS se magnetické částice proměřují v roztoku, a tím je tento hydratační obal zachován. To také může způsobit nesourodost mezi získanými velikostmi magnetických částic u obou použitých metod. Částice pro měření dynamického rozptylu světla byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.3.

Magnetické částice SiMAG-Amine a SiMAG-Carboxyl ani při změření hydrodynamické velikosti nemají takovou velikost, kterou uvádí jejich výrobce. Zdá se, že u těchto částic dochází k oddělování obalu od magnetického jádra. Čemuž nejvíce nasvědčuje nekompaktnost viditelná na snímcích ze SEM a menší velikost než 1 μm zjištěná DLS. Částice Micromer-M NH₂ a Dynabeads M-270 Amine se s velikostí udávanou výrobcem shodují, i když tyto výsledky jsou více zkreslené právě z důvodu jejich větší velikosti, při které částice rychleji sedimentují a změření jejich hydrodynamické velikosti je méně přesné. Stejně tak se velikost udávaná výrobcem shoduje s naměřenou velikostí pomocí DLS u magnetických částic ProMAG-Carboxyl. V tabulce 7 jsou uvedeny a porovnány velikosti jednotlivých magnetických částic deklarované výrobcem, stanovené pomocí elektronové mikroskopie a naměřené pomocí DLS.

Tabulka 7 Velikosti jednotlivých magnetických částic.

Magnetické částice	Uváděná velikost od výrobce [μm]	Naměřená velikost – SEM [μm]	Naměřená velikost – DLS [μm]
SiMAG-Amine	1	$0,32 \pm 0,152$	$0,545 \pm 0,31$
SiMAG-Carboxyl	1	$0,137 \pm 0,046$	$0,742 \pm 0,29$
ProMAG-Carboxyl	0,8	$0,906 \pm 0,057$	$1,005 \pm 0,209$
Micromer-M NH₂	3	$2,93 \pm 0,041$	$3,288 \pm 0,317$
Dynabeads M-270 Amine	2,8	$2,817 \pm 0,112$	$2,524 \pm 0,179$

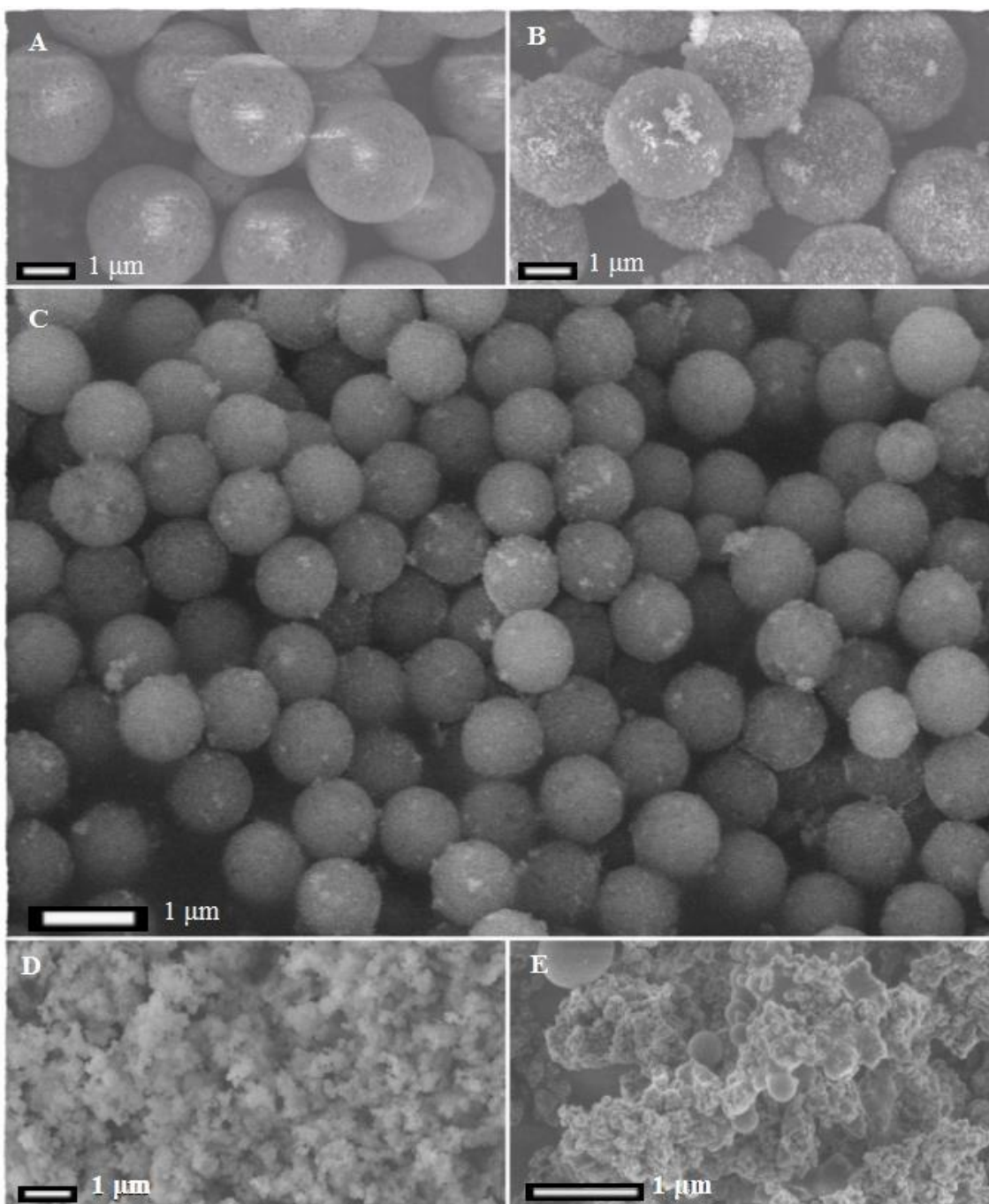
Podle výsledků z analýz SEM a DLS magnetické částice SiMAG-Amine a SiMAG-Carboxyl nespĺňujú základní kritérium pro výběr vhodných částic, kterým je monodisperzita a sférický tvar.

4.3. Příprava magnetického nosiče s α -chymotrypsinem

Cílem přípravy magnetického nosiče s imobilizovaným α -chymotrypsinem bylo zjistit optimální podmínky metody vazby ligandu, jeho optimální množství a nejvhodnější metodu blokace.

Všechny magnetické částice (viz tabulka 6) byly morfologicky hodnoceny pomocí analýzy SEM i po imobilizaci α -chymotrypsinu. A to především pro sledování změny charakteru částic po navázání modelového proteinu. Pro charakterizaci magnetických částic skenovacím elektronovým mikroskopem byly částice připraveny po vazbě α -chymotrypsinu (kap. 3.2.5.) podle metody v kapitole 3.2.2.

Hodnocena byla především jejich monodisperzita a tvorba agregátů. Snímky ze SEM všech magnetických částic jsou uvedeny na obrázku 17. Ostatní SEM snímky jsou v přílohách A – E. Uváděné rozlišení námi použitého skenovacího elektronového mikroskopu je 5 nm [262]. S tímto rozlišením nelze pozorovat imobilizované proteiny. Je tak možné sledovat pouze případné změny vzhledu magnetických částic.



Obrázek 17 SEM snímky magnetických částic po imobilizaci α -chymotrypsinu. A - Dynabeads M-270 Amine, B – Micromer-M NH₂, C - ProMAG-Carboxyl, D – SiMAG-Carboxyl, E – SiMAG-Amine.

Po navázání α -chymotrypsinu nebyly na snímcích ze SEM pozorovány morfologické změny u částic, tedy nebyla pozorována žádná agregace částic.

V dalších optimalizačních krocích byly použity opět všechny částice (viz tabulka 6). Následující kroky souvisí s imobilizací α -chymotrypsinu na magnetické částice v různém množství, různě modifikovanými metodami a s odlišným typem následné úpravy povrchu částic za účelem blokace jejich volného povrchu. Volbou modelového proteinu bylo možné

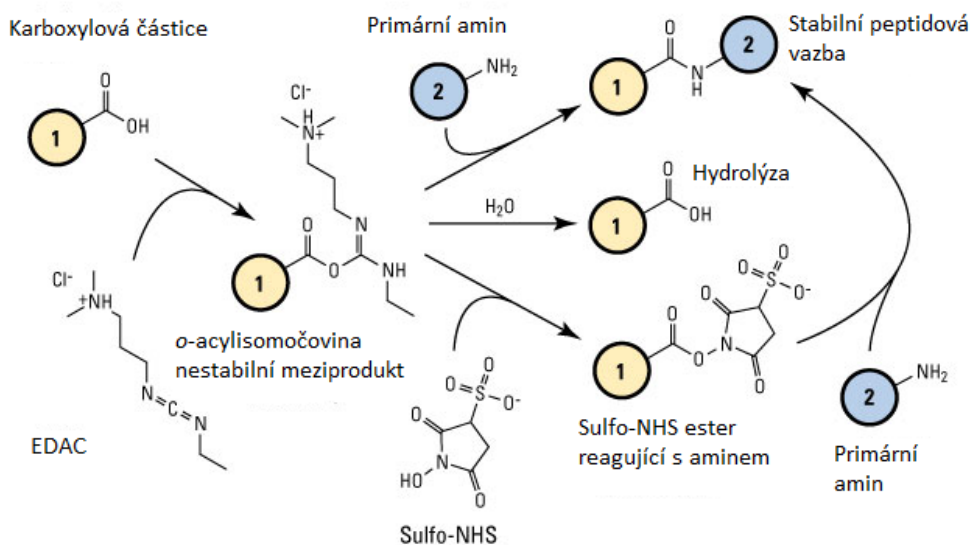
hledat optimální podmínky pro jeho vazbu k nosiči, a vhodnou modifikací volného povrchu částic zajistit podmínky minimální nespecifické sorbce proteinů z vyšetřovaných sér. Pro sledování vazebné kapacity nosičů byla stanovena koncentrace navázaného α -chymotrypsinu metodou s bicinchoninovou kyselinou (BCA test). Dále byla sledována enzymová aktivita α -chymotrypsinu.

Při imobilizaci α -chymotrypsinu byl rozdíl ve vazebném postupu u aminových a karboxylových částic. Pro vazbu ligandu byla využita karbodiimidová metoda. Přehled způsobů vazby na jednotlivé částice je přehledně shrnut v tabulce 8 a jednotlivé postupy imobilizace jsou uvedeny v kapitole 3.2.5.

Tabulka 8 Přehled způsobu karbodiimidové metody použité u jednotlivých magnetických částic.

Magnetické částice	Funkční skupina	Způsob vazby karbodiimidovou metodou
SiMAG-Amine	- NH ₂	1-kroková
SiMAG-Carboxyl	-COOH	2-kroková
ProMAG-Carboxyl	-COOH	2-kroková
Micromer-M NH ₂	- NH ₂	1-kroková
Dynabeads M-270 Amine	- NH ₂	1-kroková

Při karbodiimidové metodě dochází k aktivaci karboxylové skupiny pomocí 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDAC), za vzniku meziprojektu *o*-acylizomočoviny. Tento meziprojekt poté reaguje s primárním aminem za vzniku kovalentní vazby. Při stejném postupu imobilizace, jen s přidavkem sulfo-NHS, probíhá stejný sled reakcí, jen je vazba podpořena vznikem stabilnějšího meziprojektu, který vzniká reakcí *o*-acylmočoviny a sulfo-NHS (Obrázek 18) [242, 260, 261]. U magnetických aminových částic vzniká kovalentní vazba mezi aminovou funkční skupinou částice a aktivovaným C-koncem ligandu. U aminových částic byla využita 1-kroková karbodiimidová metoda imobilizace, kdy byl k částicím přidán EDAC, sulfo-NHS a daný ligand současně v jednom kroku. U magnetických částic s karboxylovou funkční skupinou vzniká vazba mezi částicí a primárním aminem, tedy N-koncem proteinu. U těchto částic byla využita 2-kroková karbodiimidová imobilizace, kdy se karboxylové skupiny na částicích nejprve aktivovaly přidavkem EDAC a sulfo-NHS. Po aktivaci byl nadbytek EDAC a sulfo-NHS odmyt a samotný vázaný ligand byl přidán až ve druhém kroku.

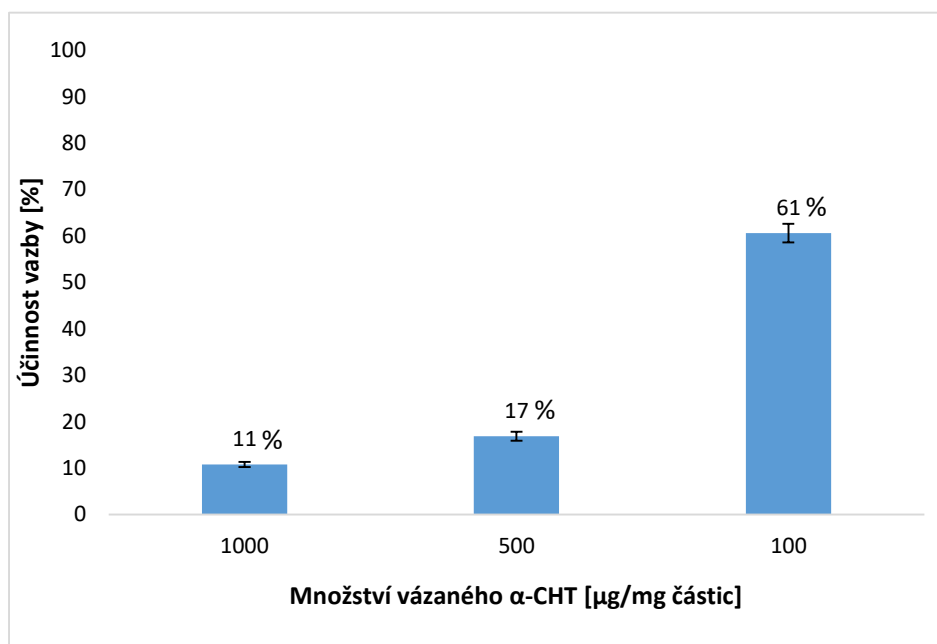


Obrázek 18 Karbodiimidová metoda imobilizace proteinu/peptidu na karboxylovou magnetickou částici s přidavkem sulfo-NHS (upraveno dle [261]).

Pro optimalizaci vazby α -chymotrypsinu na částice byly testovány tři různé koncentrace vázaného proteinu – 1000 μg , 500 μg a 100 μg na 1 mg magnetických částic, konkrétně na částice SiMAG-Amine. Při nadbytku vázaného ligandu by mohl nastat problém, pokud by se začal ligand provazovat mezi sebou. Na tyto částice byl ligand vázán 1-krokovou karbodiimidovou metodou, při které se všechny reagenty přidávají v jednom kroku. Při 2-krokové karbodiimidové imobilizaci u karboxylových částic tento problém nenastane, protože EDAC a sulfo-NHS jsou před přidáním proteinu odmyty.

Podle kapitoly 3.2.8. byla stanovena koncentrace navázaného chymotrypsinu na magnetickém nosiči bicinchoninovou metodou (BCA) pomocí komerčně dostupného kitu. Při této metodě reaguje měďnatý iont s peptidovou vazbou v zásaditém prostředí. Dochází k redukci měďnatého iontu na měďný, který vytváří barevný komplex s bicinchoninovou kyselinou. Tento komplex silně absorbuje světlo o vlnové délce 562 nm [245, 246]. Podle množství navázaného proteinu se dále určuje účinnost vazby. Tedy množství ligandu, které se imobilizovalo z původního množství vázaného ligandu. Výsledná hodnota je udávána v procentech vztažených k původní hodnotě. Výsledky z imobilizace tří různých koncentrací α -chymotrypsinu na částice SiMAG-Amine jsou uvedeny v grafu 1.

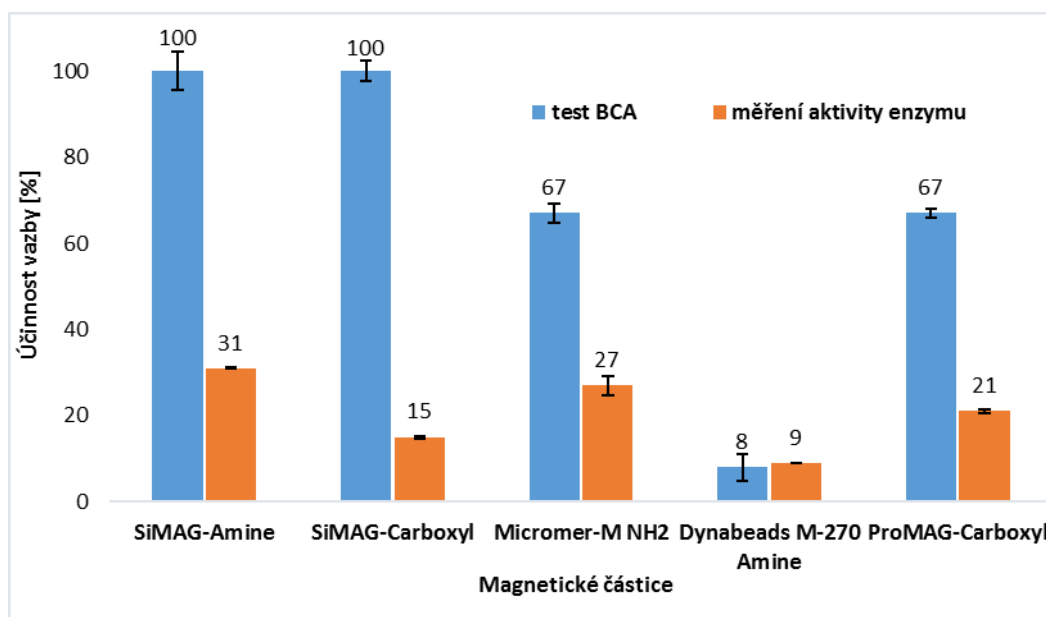
Graf 1 Optimalizace množství vázaného α -chymotrypsinu na aminové částice SiMAG-Amine. Množství imobilizovaného α -chymotrypsinu stanoveno pomocí BCA testu. Výsledky ze dvou opakování.



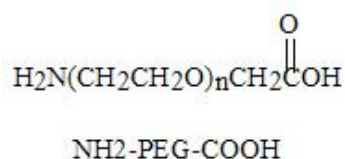
Při 1-krokové karbodiimidové imobilizaci α -chymotrypsinu, konkrétně při vazbě 1000 μg a 500 μg proteinu na částice SiMAG-Amine, byl pozorován vznik agregátů. Protein byl vázán ve velkém nadbytku a následně se při inkubaci provazoval mezi sebou a tvořil agregáty. U vázané koncentrace 1000 μg α -chymotrypsinu tyto agregáty obsahovaly i magnetické částice. Největší účinnost vazby ligandu byla zjištěna při imobilizaci 100 μg α -chymotrypsinu na 1 mg magnetických částic (Graf 1). V grafu 1 je zřetelný trend snižující se účinnosti vazby proteinu se vzrůstajícím množstvím imobilizovaného proteinu. Při vazbě 100 μg modelového proteinu je zřejmě plně využita vazebná kapacita částic a účinnost vazby je největší.

Po optimalizaci množství vázaného α -chymotrypsinu na aminové magnetické částice, bylo na všechny námi vybrané magnetické částice, tedy i karboxylové, navázáno 100 μg α -chymotrypsinu. Množství navázaného α -chymotrypsinu na částicích bylo stanovováno pomocí testu BCA a měřením jeho aktivity. Aktivita enzymu navázaného na magnetické částice byla stanovena pomocí nízkomolekulárního substrátu SUPHEPA. Tento substrát s α -chymotrypsinem dává vzniknout barevnému produktu 4-nitroanilinu, který lze spektrofotometricky změřit při 405 nm (viz 3.2.7.). Graf 2 zobrazuje množství navázaného α -chymotrypsinu na jednotlivé magnetické částice.

Graf 2 Stanovení účinnosti vazby α -chymotrypsinu na magnetických částicích. Stanovováno pomocí testu BCA a měřením aktivity enzymu. Výsledky ze dvou opakování.



Nezaregované aktivované funkční skupiny na magnetických částicích s imobilizovaným α -chymotrypsinem byly blokovány heterobifunkčním polyethylenglykolem (PEG) s karboxylovou skupinou na jednom konci a aminovou skupinou na druhém – CM-PEG-NH₂ (Obrázek 19) podle [263]. Jeho velikost je 3,4 kDa. Blokování magnetických částic po imobilizaci ligandu pomocí PEGu má své výhody. Po PEGylaci dojde ke snížení nespecifických interakcí s proteiny a také se sníží přilnavost částic k plastovým povrchům. PEG také zlepšuje koloidní stabilitu částic a může sloužit jako prostředek pro následnou imobilizaci ligandů [243]. Využití tohoto PEGu bylo záměrné i z důvodu jeho menší velikosti oproti blokačnímu proteinu BSA, čímž by nemělo docházet ke stericke zábraně ligandu imobilizovaného na magnetické částici [244]. V předešlé diplomové práci byla porovnávána účinnost blokace pomocí 1 % BSA, anebo PEGu. Blokace 1 % BSA však nebyla účinná. U PEGylovaných částic docházelo k většímu potlačení nespecifické sorbce konjugátu a ke zefektivnění vazby ligandu na částice [241].



Obrázek 19 Vzorec CM-PEG-NH₂ o velikosti 3,4 kDa [263].

Na základě stanoveného množství vázaného α -chymotrypsinu na magnetických částicích byl vybrán nosič, u kterého bylo docíleno nejvyšší účinnosti imobilizace. Ta signalizovala zároveň nejvyšší vazebnou kapacitu magnetického nosiče. Jako nejlepší se jevily částice SiMAG-Amine, na něž byl α -chymotrypsin navázán s účinností 100 %. Podle výsledků aktivity enzymu bylo navázáno pouze 31 % z celkového množství vázaného α -chymotrypsinu. Nižší hodnota aktivity enzymu je nejspíše způsobena zablokováním aktivního místa vazbou proteinu na magnetickou částici. Částice SiMAG-Amine ale nebyly vybrány z důvodu nevyhovujícího charakteru samotného nosiče zjištěného pomocí SEM a DLS. V porovnání částic Micromer-M NH₂ a Dynabeads M-270 Amine bylo více α -chymotrypsinu navázáno na částice Micromer-M NH₂. Ze souboru výsledků vyplývá, že částice Micromer-M NH₂ mají větší aktivní plochu na svém povrchu pro navázání proteinu. Tyto výsledky korelují s výsledky uvedenými v předešlé diplomové práci, kde se částice charakterizovaly právě z pohledu množství navázaného modelového proteinu [241]. Částice ProMAG-Carboxyl mají podobnou účinnost imobilizace α -chymotrypsinu jako částice Micromer-M NH₂. Předností částic ProMAG-Carboxyl je však menší velikost, která je pro metodu MELISA výhodnější. A to z důvodu pomalejší sedimentace částic, tudíž lepšího rozptýlení částic v roztoku v jamce mikrotitrační destičky během jednotlivých kroků MELISA metody.

4.4. Optimalizace metody ELISA s využitím magnetických částic

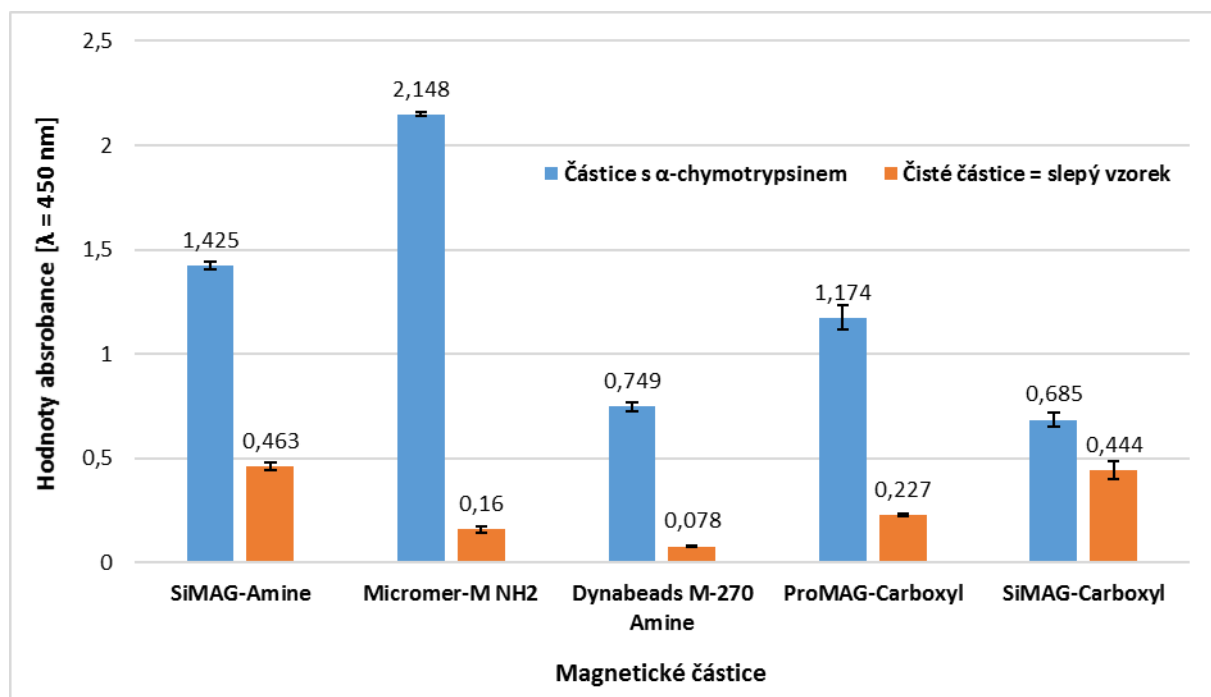
V modelovém systému chymotrypsin – anti-chymotrypsinové protilátky bylo sledováno chování částic v jamkách mikrotitrační destičky při práci, a také především jak vysoká byla nespecifická sorbce při použití různých magnetických nosičů. Snahou byla dosáhnout co nejmenšího pozadí, potažmo co nejvíce odstínit nespecifickou sorbci látek ze séra a případně i nespecifickou sorbci sekundární protilátky. Proto je důležitá i příprava částic použitých jako slepé vzorky. Ty se vždy připravovaly současně a stejným způsobem jako částice s daným proteinem. Slepé vzorky tak byly skoro totožné jako nosič s ligandem, až na nepřítomnost vázaného ligandu.

V tomto modelovém systému byly ještě stále porovnávány mezi sebou všechny vybrané magnetické částice. Sledovalo se tedy chování částic při MELISA metodě a výsledné hodnoty absorbancí. Magnetické částice by neměly agregovat, ani sedimentovat na dno a sorbovat v jamce, také musí být dostatečně přitahovány magnetem, aby nedocházelo k jejich

ztrátě při odstraňování supernatantu v jednotlivých krocích metody MELISA. Hodnoty absorbancí u slepých vzorků udávají velikost pozadí testu, ve kterém je zahrnuta nespecifická sorbce ze séra. Hodnoty absorbance u slepých vzorků by se ideálně měly pohybovat do hodnoty 0,3. Hodnoty absorbance u částic s vázaným antigenem po odečtení hodnot absorbance slepých vzorků odpovídají výsledné hodnotě množství volných protilátek, které se na magnetické částice navázaly ze séra.

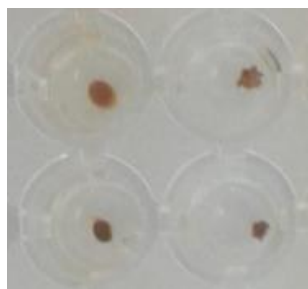
Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo aplikováno vždy 50 µg magnetických částic s imobilizovaným α-chymotrypsinem, a jako slepé vzorky byly aplikovány částice bez antigenu. Ke slepým vzorkům bylo přidáváno stejně ředěné anti-chymotrypsinové sérum i konjugát ve stejných krocích jako u magnetických částic s antigenem (viz 3.2.11.). Pro toto porovnání částic nebylo využito kalibrační řady ředění séra, ale bylo použito jen jedno ředění, a to 1:15 000 testované v tripletu. Toto ředění vychází z předchozích optimalizací, které zde nejsou uvedeny.

Graf 3 Porovnání magnetických částic mezi sebou podle výsledných hodnot absorbancí naměřených metodou MELISA v modelovém systému. Výsledky ze tří opakování.



Magnetické částice SiMAG-Amine měly poměrně vysokou odezvu absorbance u částic s vázaným antigenem při metodě MELISA v modelovém systému, bohužel hodnoty slepých vzorků byly vyšší, nad hodnotou absorbance 0,3 u slepých vzorků. U magnetických částic SiMAG-Carboxyl byla nízká odezva absorbance u částic s antigenem a vysoká hodnota

slepých vzorků (viz Graf 3). Magnetické částice Micromer-M NH₂ a Dynabeads M-270 Amine při inkubaci na třepačce sedimentovaly do středu jamek (Obrázek 20). Toto chování odpovídalo jejich větší velikosti pohybující se kolem 3 μm (viz kapitola 4.2.). Na částice Dynabeads M-270 Amine se navázalo nejméně α-chymotrypsinu ze všech magnetických částic (viz Graf 2) a podle grafu 3 dávaly i menší odezvu při metodě MELISA v porovnání s částicemi Micromer-M NH₂.



Obrázek 20 Sedimentace částic Dynabeads M-270 Amine na dno jamek v mikrotitrační destičce v průběhu inkubačních kroků metody MELISA.

Podle výsledků z grafu 3 by se jako nejvhodnější jevily právě částice Micromer-M NH₂ nebo ProMAG-Carboxyl, které mají nízké hodnoty absorpce u slepých vzorků, tedy menší než 0,3. Avšak pro metodu MELISA je vhodnější co nejmenší velikost nosiče. Takovéto částice při dlouhodobějších inkubacích na třepačce tolik nesedimentují na dno jamek a jsou resuspendované v celém objemu, tudíž i lépe přístupné pro vazbu.

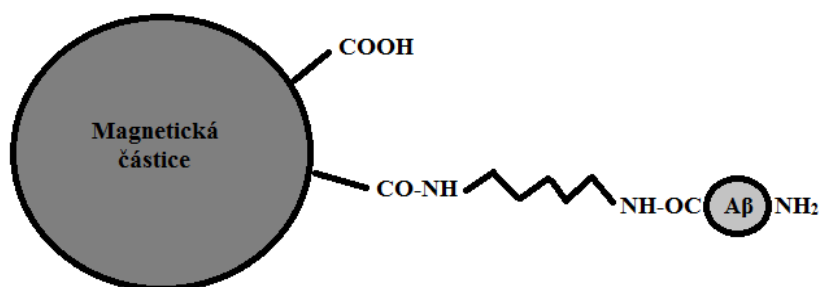
Nejvhodnější nosič byl vybírán podle výsledků vazebné kapacity, dále podle chování částic a výsledných hodnot absorpce získané metodou MELISA v modelovém systému (viz kap. 4.3.), a v kombinaci s výsledky ze skenovacího elektronového mikroskopu a dynamického rozptylu světla (viz kap. 4.2.). Proto byly nakonec jako vhodný magnetický nosič vybrány částice ProMAG-Carboxyl.

4.5. Příprava magnetického nosiče s Aβ (1-42) peptidem

Při přípravě magnetického nosiče s Aβ (1-42) bylo pracováno s faktem, že při vazbě Aβ do jamky mikrotitrační destičky je využíváno absorpčních nesespecifických sil nebo aktivace povrchu jamky pomocí glutaraldehydu, což znamená vazbu peptidu přes jeho N-konec. Aktivovaný povrch jamky pomocí glutaraldehydu totiž kovalentně spojuje navzájem aminové konce [260]. Proto bylo předpokladem, že pokud při ELISA metodě

v mikrotitrační destičce nelze vázat peptid A β orientovaně přes jeho C-konec, měly by se anti-A β protilátky ze séra i přes stérickou zábranu vázat na antigen imobilizovaný přes jeho N-konec na karboxylových částicích. Vhodnější se tedy jeví pracovat s částicemi s aminovou funkční skupinou. Bohužel firma Bangs Laboratories od výroby takovýchto částic upustila a vyrábí již pouze karboxylové částice.

Rozhodli jsme se proto přistoupit k modifikaci ProMAG-Carboxyl částic a zaměnit jejich karboxylové funkční skupiny za aminové s využitím homobifunkčního polyethylenglykolu s aminovými skupinami (bisaminoPEG). Schéma magnetického nosiče s imobilizovaným A β peptidem je na obrázku 21. Tento bisaminoPEG je velký 1,5 kDa. Díky této modifikaci došlo k záměně karboxylové skupiny za aminovou pomocí tzv. „raménka“ [269]. BisaminoPEG byl na magnetické částice imobilizován 2-krokovou karbodiimidovou metodou. Následná imobilizace A β (1-42) peptidu probíhala pomocí 1-krokové karbodiimidové metody (viz 3.2.6.).



Obrázek 21 Schéma vazby A β (1-42) peptidu přes bisaminoPEG na karboxylové magnetické částice.

Bylo přistoupeno ještě k jedné optimalizaci přípravy magnetického nosiče. Pro vazbu bisaminoPEGu bylo třeba optimalizovat jeho množství. Na základě předchozích zkušeností z vazby α -chymotrypsinu byla převzata koncentrace CM-PEG-NH₂ používaná pro blokaci nosiče, která ale pro tento bisaminoPEG nebyla použitelná. Příliš velké množství bisaminoPEGu způsobilo silnou sorpci částic na stěnu mikrozkuhavky a při promývání částic i na špičky. Proto bylo připraveno 5 alikvotů magnetických částic s různou koncentrací imobilizovaného bisaminoPEGu, viz tabulka 9. Stabilita částic s vázaným bisaminoPEGem byla ověřena pomocí změření zeta-potenciálu různě připravených částic. Zeta-potenciál určuje stabilitu koloidních roztoků. Při výsledných hodnotách zeta-potenciálu větších než 30 mV nebo menších než -30 mV jsou částice stabilní, to znamená že nejsou náchylné k tvorbě agregátů [256].

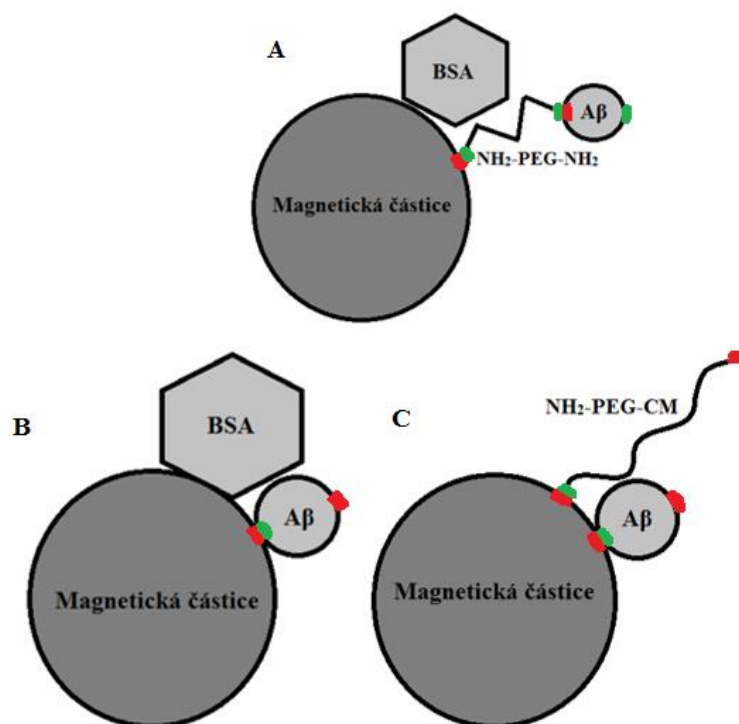
Tabulka 9 Výsledky měření zeta-potenciálu. Částice bez vázaného A β (1-42) peptidu, imobilizován pouze bisaminoPEG.

Vzorek	ZP [mV]	SD
používaný pufr	-9,22	1,64
částice	-30,6	1,51
0,1 mg bisaminoPEG	-27	0,78
0,012 mg bisaminoPEG	-28,1	0,52
0,006 mg bisaminoPEG	-29,2	1,63
0,003 mg bisaminoPEG	-29,5	0,94

Vysvětlivky: ZP – zeta-potenciál; SD – směrodatná odchylka

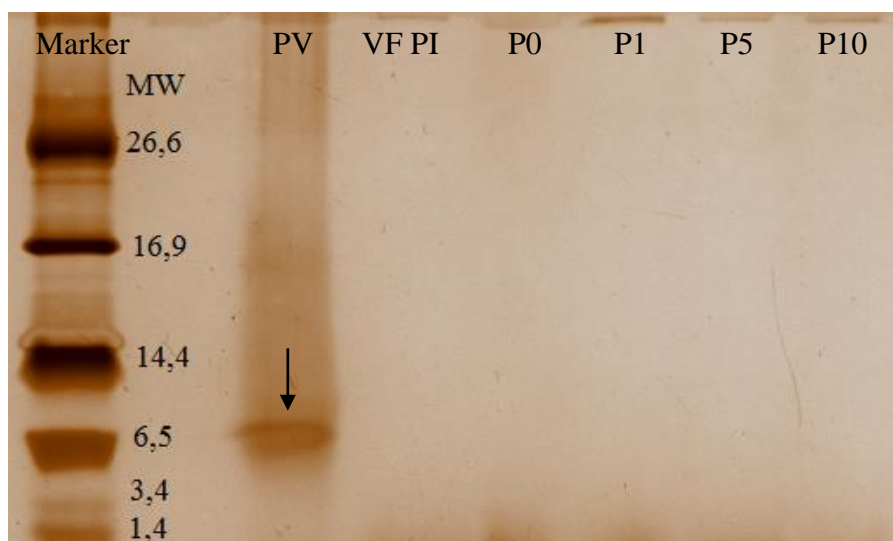
Z výsledků v tabulce 9 je patrné, že bisaminoPEG nijak zásadně nesnižuje stabilitu magnetických částic. A také že částice s imobilizovaným množstvím bisaminoPEGu o koncentraci 0,003 mg, jsou ze všech ostatních vazeb tohoto PEGu nejstabilnější a nejméně náchylné k agregaci.

V systému A β tak byly porovnávány dvě základní varianty přípravy nosiče, a to vazba A β (1-42) na karboxylové částice ProMAG-Carboxyl bez a s bisaminoPEG raménkem. Částice byly různě blokovány. U částic s modifikací bisaminoPEG raménkem bylo k blokaci použito 1 % BSA. Magnetické částice připravované bez raménka byly blokovány 1 % BSA nebo polyethylenglykolem CM-PEG-NH₂. Všechny varianty připravených nosičů jsou znázorněny na Obrázku 22.



Obrázek 22 Schematické nákresy různých vazeb A β (1-42) peptidu na magnetické částice. A – vazba přes raménko s blokací 1 % BSA, B – vazba peptidu s blokací 1 % BSA, C – vazba peptidu s blokací pomocí CM-PEG-NH₂. Zelená barva značí aminový konec sloučeniny/peptidu, červená barva konec karboxylový.

Při kvantifikaci A β (1-42) peptidu imobilizovaného na magnetické částice, se test BCA nejevil jako vhodný postup kvantifikace. Ačkoli kvantifikace A β peptidů testem BCA je jedním ze způsobů stanovení jeho koncentrace [264], v zásadě se ale vždy jedná o stanovení solubilního peptidu. Zde ale bylo nutno kvantifikovat množství A β peptidu imobilizovaného na magnetických částicích. V průběhu testu nejspíše dochází k interferencím s matricí částic nebo zbytků aktivačních činidel použitých při předchozí vazbě ligandů a test tudíž není hodnotitelný. Také k tomu může přispívat vysoké pozadí slepých vzorků u magnetických nosičů. Test BCA byl prováděn na magnetickém nosiči po vazbě A β (1-42) ale před jeho blokací. Množství navázaného A β (1-42) peptidu tedy bylo stanovováno pomocí Tricin-SDS-PAGE elektroforézy (viz 3.2.7.). Barvení gelů bylo prováděno stříbrem (viz 3.2.8.) a citlivost tohoto barvení gelů je v řádu nanogramů [247, 248, 265]. Tricin-SDS-PAGE elektroforézou byly hodnoceny vazebné a promývací frakce. A β (1-42) peptid se na elektroforetickém gelu v žádné testované frakci nedetekoval. Na 1 mg magnetického nosiče bylo vždy imobilizováno 50 μ g A β (1-42) peptidu. Z vazebných frakcí bez A β peptidu se dá usuzovat, že se vždy navázalo téměř 100 % z imobilizovaného peptidu. Z promývacích frakcí bez detekovaného A β (1-42) je patrné, že při promývání magnetického nosiče nedochází ke ztrátě peptidu. Pro ukázkou je zde uveden jeden výsledný gel (Obrázek 23).



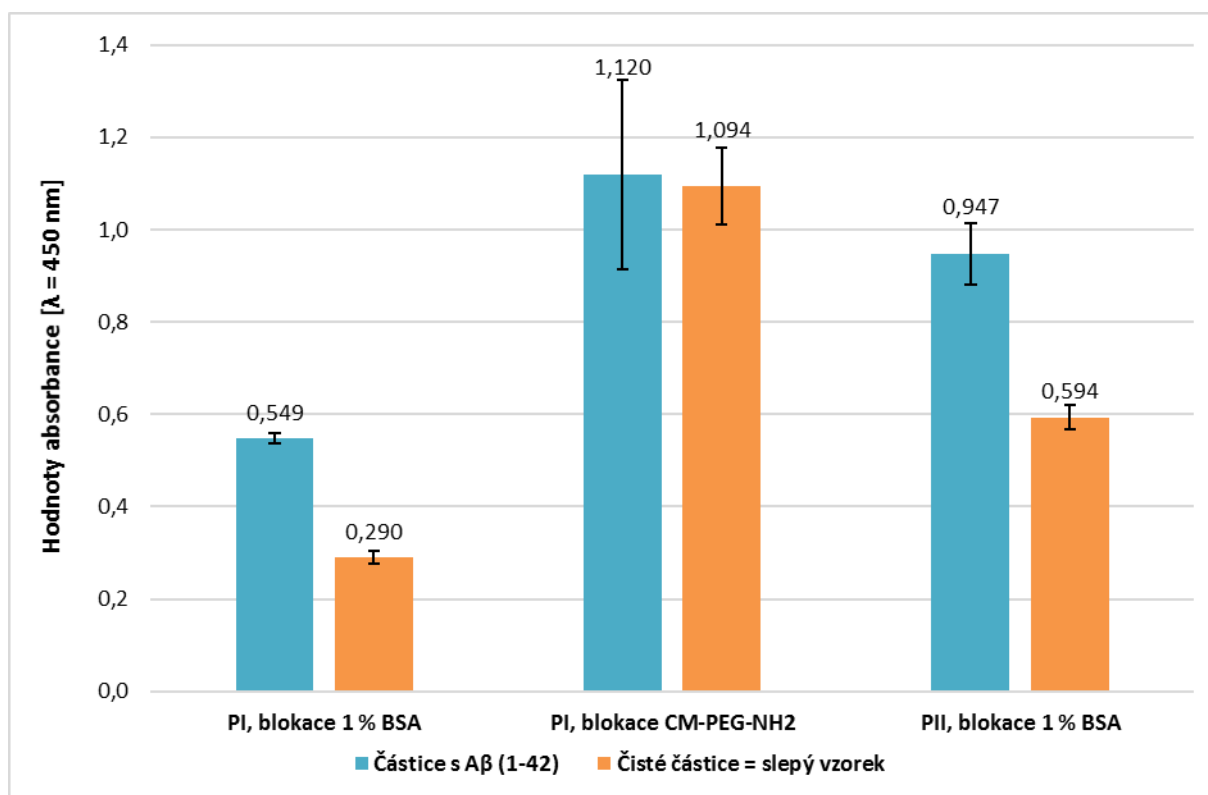
Obrázek 23 Tricin-SDS-PAGE elektroforéza. Marker – polypeptiový marker; PV – původní frakce obsahující 5 µg Aβ (1-42); VF PI – vazebná frakce částic bez můstku blokované CM-PEG-NH₂; P1, P5, P10 – promývací frakce (1., 5. a 10. promytí). Šipkou označena přítomnost Aβ (1-42) peptidu.

4.6. Vývoj metody ELISA s využitím magnetických částic pro detekci Aβ protilátek

Pacientská séra jsou komplexním materiálem, který obsahuje mnoho proteinů a protilátek. Proto se u pacientských sér předpokládalo s mnohem vyšší nespecifickou sorbcí. Postup pro provedení metody MELISA byl převzat z předešlé diplomové práce [241] a je uveden v kap. 3.2.13.

První byly testovány tři varianty nosiče metodou MELISA. Těmi byly ProMAG-Carboxyl částice s imobilizovaným Aβ (1-42) přes raménko blokované 1 % BSA, nebo bez raménka s blokací 1 % BSA či polyethylenglykolem CM-PEG-NH₂. V tomto testu byla sledována odezva magnetického nosiče s vychytanými anti-Aβ (1-42) autoprotiilátkami ze séra metodou MELISA. Čím větší je hodnota absorbance u nosiče s antigenem, tím citlivěji nosič reagoval na hladinu volných anti-Aβ (1-42) autoprotiilátek v pacientském séru. S tím ale také souvisí výsledná hodnota absorbance u slepých vzorků, která ukazuje pozadí testu. To v případě měření s pacientskými séry udává především hodnotu nespecifické sorbce. Slepé vzorky byly pro všechny již zmíněné varianty nosiče připraveny totožným způsobem jako nosič s Aβ peptidem, jen bez ligandu. Během MELISA metody pak byly částice bez peptidu inkubovány se sérem i konjugátem stejně jako částice s peptidem. Výsledky jsou uvedeny v grafu 4.

Graf 4 Stanovení hladiny anti-A β (1-42) autoprotilátek metodou MELISA pomocí tří různě připravených magnetických nosičů ProMAG-Carboxyl s imobilizovaným A β (1-42). PI – částice připravené bez bisaminoPEG raménka; PII – částice připravené s bisaminoPEG raménkem. Výsledky ze tří opakování.

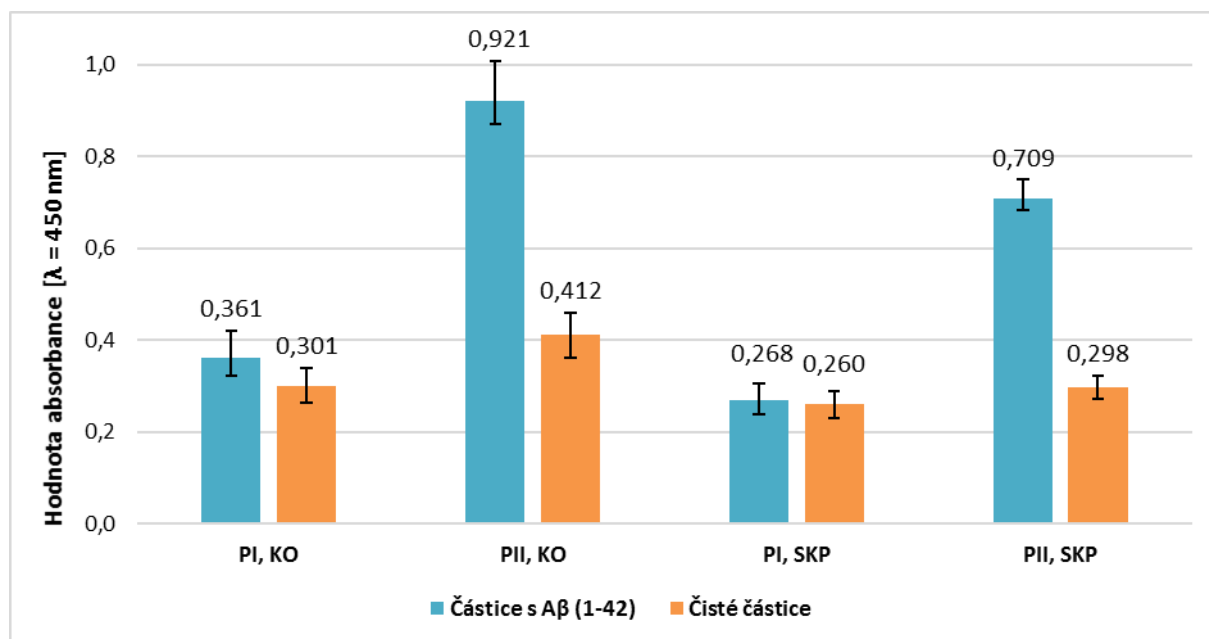


Částice bez raménka blokované proteinem BSA mají nižší odezvu absorbance než částice modifikované bisaminoPEG raménkem (Graf 4). Toto raménko se použilo především z důvodu záměny karboxylové funkční skupiny na magnetické částici za aminovou skupinu. Jak je ale vidět na výsledcích z grafu 4, raménko z bisaminoPEGu způsobilo i citlivější odezvu metody. Ta byla nejspíše způsobena oddálením A β (1-42) peptidu od magnetické částice a lepšimu zpřístupnění antigenu pro vazbu anti-A β (1-42) autoprotilátek ze sér. Od blokování pomocí polyethylenglykolu CM-PEG-NH₂ nakonec bylo odstoupeno z důvodu vysoké nespecifické sorbce séra na čisté částice, které sloužily jako slepé vzorky (viz Graf 4). Z těchto testovaných magnetických nosičů se dále vybíralo z částic s a bez modifikace bisaminoPEG raménkem.

Dále už byly pro částečné porovnání analyzovány protilátky ze dvou patientských sér, jedna zdravá kontrola a jeden pacient se smíšenou kognitivní poruchou (SKP) (Graf 5). Magnetické nosiče byly blokovány již pouze 1 % BSA. V tomto experimentu byla opět sledovaným parametrem modifikace částic bisaminoPEG raménkem (viz Obrázek 21), zda

tato modifikace ovlivní míru vazby specifických protilátek anti-A β (1-42) na magnetický nosič.

Graf 5 Stanovení hladiny anti-A β (1-42) autoprotilátek metodou MELISA – porovnání magnetických částic ProMAG-Carboxyl s imobilizovaným A β (1-42) a blokováné 1 % BSA. PI – částice připravené bez raménka; PII – částice připravené s bisaminoPEG raménkem; KO – sérum kontrolního pacienta; SKP – sérum pacienta se smíšenou kognitivní poruchou. Výsledky ze tří opakování.



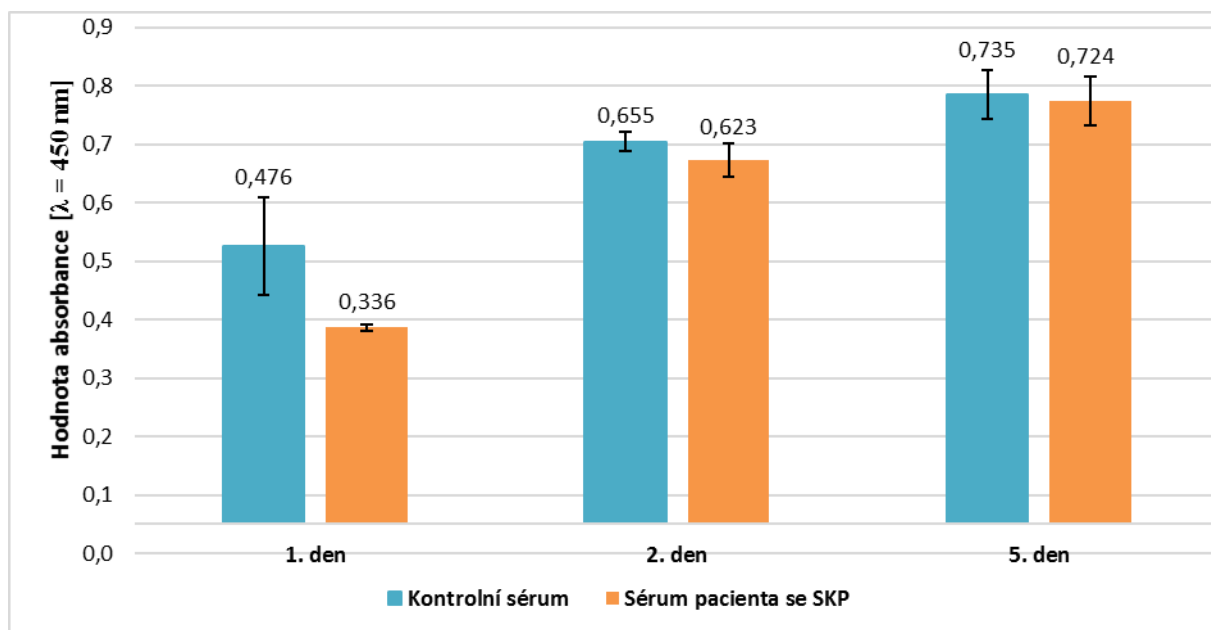
Nosič s imobilizovaným A β (1-42) peptidem bez raménka dával mnohem nižší hodnoty absorbance odpovídající množství autoprotilátek v séru, a naopak u něj byly vyšší hodnoty absorbancí u slepých vzoků. Tento nosič vykazoval vyšší náchylnost k nespecifickým interakcím oproti nosiči s modifikací bisaminoPEG raménkem. Takovýto trend u nosiče bez raménka byl zřejmě způsoben samotnou blokadí proteinem BSA a také důležitým faktem, že na tyto částice je A β peptid vázán svým N-koncem. Tedy, že je vazebné místo, v porovnání s modifikovaným nosičem bisaminoPEG raménkem, stéricky méně přístupné pro anti-A β (1-42) protilátky. Toto vazebné místo se nachází u N-konce A β (1-42) peptidu [156]. Dále je protein BSA mnohem větším (66,5 kDa) než samotný A β (1-42) peptid (4,5 kDa), a při blokaci je možné, že BSA stéricky zabráni specifické interakci s autoprotilátkami proti A β (1-42) ze séra.

Z výše uvedených výsledků se jako nejvhodnější magnetický nosič pro stanovení anti-A β (1-42) autoprotilátek vybraly částice ProMAG-Carboxyl s vázaným A β (1-42) přes bisaminoPEG raménko a blokováné 1 % BSA.

4.6.1. Sledování skladovací stability magnetického nosiče metodou MELISA

Pro charakterizaci nosiče z pohledu jeho skladovací stability, byly připraveny magnetické částice ProMAG-Carboxyl s peptidem A β (1-42) vázaným přes bisaminoPEG raménko (Obrázek 21). Magnetický nosič se skladoval v PBS pufru pH 7,4 při 4 °C. Byly provedeny dva na sobě nezávislé experimenty, kdy jeden experiment sledoval stabilitu v krátkém časovém úseku, konkrétně 5 dnů. Během těchto pěti dnů byly třikrát stanoveny anti-A β (1-42) autoprotiátky ve stejných patientských sérech, v jednom kontrolním séru a v jednom séru pacienta se SKP. Stanovení anti-A β (1-42) protilátek bylo provedeno metodou MELISA s magnetickým nosičem z totožného alikvotu připravených částic. Výsledky tohoto experimentu jsou uvedeny v grafu 6.

Graf 6 Stanovení hladiny anti-A β (1-42) autoprotilátek metodou MELISA – sledování krátkodobé stability nosiče ProMAG-Carboxyl s imobilizovaným A β (1-42) a blokováním 1 % BSA. KO – sérum kontrolního pacienta; SKP – sérum pacienta se smíšenou kognitivní poruchou. Výsledky ze tří opakování.

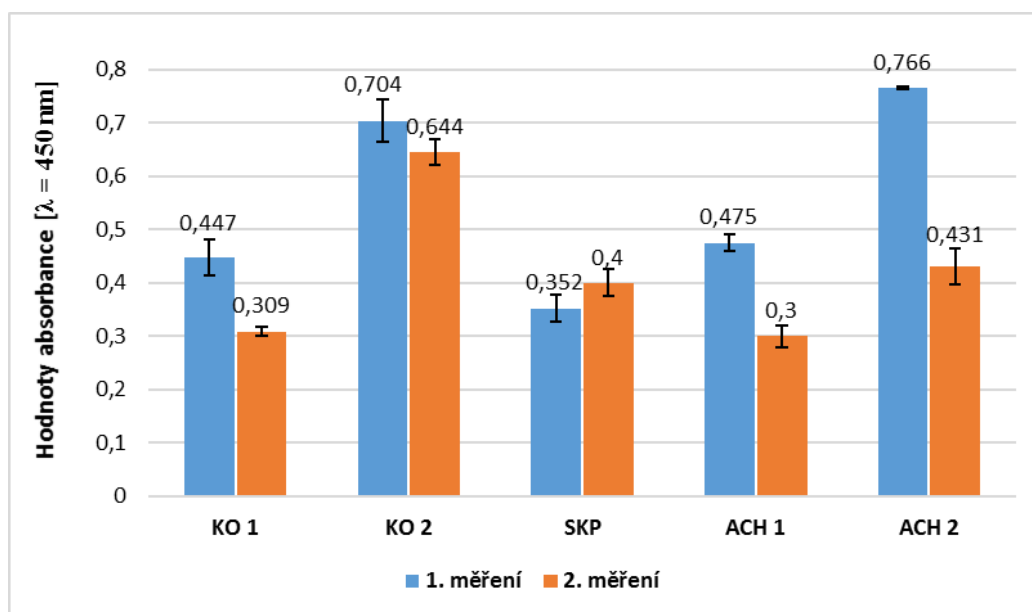


Z grafu 6 je patrný zajímavý efekt, že při stanovení hned po přípravě magnetického nosiče jsou hodnoty absorbancí nižší než při použití magnetického nosiče druhý den nebo dokonce i pátý den od jeho přípravy. Tento efekt se dá vysvětlit tím, že při přípravě nosiče je snížena biologická aktivita A β (1-42) peptidu. Ta je spojena s konformací proteinu, která může být vazbou ovlivněna, a postupně se obnovuje až nějakou dobu po vazbě.

Během druhého experimentu byla sledována dlouhodobá stabilita magnetického nosiče. Zde bylo provedeno stanovení autoprotilátek proti A β (1-42) u souboru pěti

pacientských sér – 2 kontrolní séra, jedno sérum pacienta se SKP a 2 séra pacientů s ACH. První měření bylo provedeno 4 dny po přípravě nosiče. Další měření proběhlo po uplynutí 4 týdnů s totožným alikvotem magnetických částic u stejných patientských sér.

Graf 7 Stanovení hladiny anti-A β (1-42) autoprotilátek metodou MELISA – sledování dlouhodobé stability nosiče ProMAG-Carboxyl s imobilizovaným A β (1-42) a blokováním 1 % BSA. 1. měření provedeno čtyři dny po přípravě nosiče, 2. měření provedeno 4 týdny po přípravě nosiče. Výsledky ze tří opakování. KO – sérum kontrolního pacienta; SKP – sérum pacienta se smíšenou kognitivní poruchou; ACH – sérum pacienta s ACH.



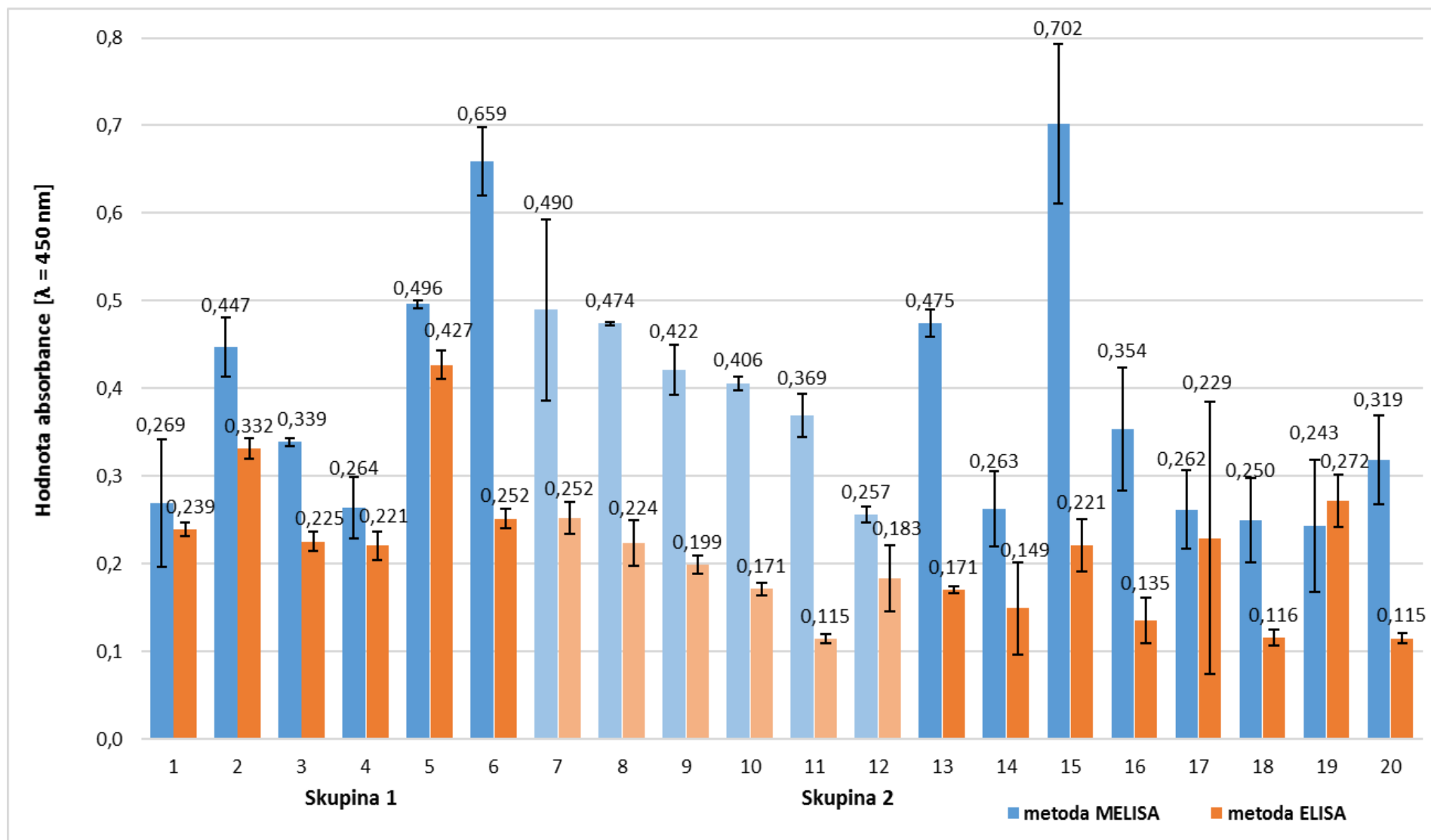
V grafu 7, který znázorňuje výsledné hodnoty absorbancí změřených na stejném magnetickém nosiči se stejnými patientskými séry, je patrné skoro u všech vzorků snížení hodnot absorbancí při skladování nosiče po 4 týdny. Snížené hodnoty byly pozorovány i u slepých vzorků. To že u kontrolního séra 2 a v séru pacienta se SKP nedošlo k tak výraznému snížení či došlo přímo k opačnému ději, je nejspíše způsobeno i povahou biologického materiálu a zahrnuje zřejmě také chybu měření.

Na závěr této kapitoly věnové stabilitě nosiče lze usuzovat, že tento nosič je krátkodobě stabilní. Dokonce je vhodnější použít nosič nejdříve druhý den po jeho přípravě. Ovšem skladování nosiče 4 týdny a déle není vhodné. Nosič si dlouhodobě neudržuje svoji aktivitu pro stanovení anti-A β (1-42) autoprotilátek.

4.7. Stanovení hladiny autoprotilátek proti A β (1-42) v patientských sérech metodou MELISA

Pro metodu ELISA na magnetických částicích byly použity částice ProMAG-Carboxyl s imobilizovaným bisaminoPEG raménkem a na něm vázaným A β (1-42) peptidem (Obrázek 21). Částice byly blokovány 1 % BSA. Anti-A β protilátky se stanovovaly u 20 patientských sér ředěných 1:100, a měření bylo provedeno v tripletech. [156, 168, 241]. Stanovení autoprotilátek anti-A β (1-42) metodou MELISA bylo prováděno paralelně i s metodou ELISA v destičce. Postup pro metodu ELISA v mikrotitrační destičce je v kap. 3.2.12. Do jamky mikrotitrační destičky bylo aplikováno 0,05 mg magnetických částic. Což při úvaze, že se na 1 mg magnetického nosiče navázalo 100 % z vázaných 50 μ g A β (1-42), odpovídalo množství 2,5 μ g A β (1-42) na jamku mikrotitrační destičky. Proto se při vazbě antigenu do jamky mikrotitrační destičky imobilizovaly 2 μ g peptidu A β (1-42). Toto množství imobilizovaného A β (1-42) na jamku bylo vybráno především z důvodu se co nejvíce přiblížit imobilizovanému množství na magnetickém nosiči. Ve studiích, kde stanovují anti-A β autoprotilátky váží mnohem menší množství antigenu. Konkrétně v různých studiích vázali různé množství A β peptidu na jamku mikrotitrační destičky. Ve studii Klaver (2011) to bylo 0,09 μ g A β (1-42) peptidu [168], ve studii Szabo (2010) 0,1 μ g A β peptidu [154] a jako poslední příklad uvedeme studii Piazza (2013), kde vázali 1 μ g A β (1-42) peptidu [172]. Výsledky ze stanovení autoprotilátek proti A β (1-42) ve 20 patientských sérech jak metodou MELISA, tak metodou ELISA v mikrotitrační destičce jsou znázorněny v grafu 8.

Graf 8 Stanovení hladiny anti-A β protilátek v sérech pacientů metodou MELISA a metodou ELISA v mikrotitrační destičce. Skupina 1 – normální sérum, Skupina 2 – pacienti se smíšenou kognitivní poruchou (světlý odstín) nebo s ACH. Výsledky ze tří opakování.



Při porovnání obou metod se zdá, že je citlivější metoda MELISA (viz Graf 8). Nevýhodou jsou však vysoké hodnoty u slepých vzorků, které jsou způsobeny samotnými částicemi a nespecifickou sorbcí proteinů ze séra na magnetické částice. Hodnoty slepých vzorků se u magnetického nosiče v průměru pohybovaly v rozmezí absorbance 0,33–0,5. Ale i přesto jsou celkově výsledné hodnoty u vzorků vyšší než u metody ELISA v mikrotitrační destičce. Hodnoty slepých vzorků u metody ELISA jsou také poměrně vysoké v porovnání s normálními hodnotami slepých vzorků při metodě ELISA, které se pohybují kolem 0,05 hodnoty absorbance. Při tomto stanovení anti-A β (1-42) autoprotilátek se slepé vzorky u metody ELISA v mikrotitrační destičce pohybovaly v rozmezí absorbance 0,12 až 0,18. U některých vzorků byly hodnoty slepých vzorků dokonce ještě vyšší, a toto zvýšení se projevilo u obou metod. Zvýšené hodnoty slepých vzorků určující pozadí testu jsou způsobené nespecifickou sorbcí ze séra, která se u každého vzorku může projevovat jinak razantně.

Při metodě ELISA se peptid na destičku kovalentně váže pomocí aktivace přes glutaraldehyd. Tento způsob kovalentně spojuje navzájem aminové konce [260]. A β (1-42) peptid je na stěnu jamky vázán přes svůj N-konec, a autoprotilátky z měřených sér, které jsou cílené na aminokyseliny na N-konci peptidu, se nejspíše nemohou dobře vázat. Odezva v jamkách s antigenem u metody ELISA v mikrotitrační destičce by se teoreticky dala zvýšit menším naředěním patientských sér, což by ale mohlo zároveň způsobit zvýšení nespecifické sorbce ze séra.

Dále je z výsledků v grafu 8 viditelný trend většího množství autoprotilátek u zdravých kontrol a méně autoprotilátek u pacientů s ACH nebo smíšenou kognitivní chorobou [159–161]. Tento trend je velice málo patrný a u tak malého souboru proměřených pacientů nelze s jistotou potvrdit stanovisko zvýšených volných autoprotilátek anti-A β (1-42) u zdravých kontrol. Každý pacient by se ale měl hodnotit individuálně v souladu s komplexní diagnózou. Což je i z grafu 8 patrné.

5. Závěr

Cílem této diplomové práce byla optimalizace ELISA metody s využitím magnetických částic pro stanovení autoprotilátek proti A β (1-42) v patientských a kontrolních sérech.

Prvně byl vybírán magnetický nosič, který byl následně při metodě MELISA pro stanovení anti-A β (1-42) využit. Nosič byl vybírán z 5 vhodných částic. Ty se lišily nejen ve velikosti a složení, ale také v typu funkčních skupin přítomných na svém povrchu částic. Byly testovány částice s aminovou skupinou – SiMAG-Amine, Micromer-M NH₂, Dynabeads M-270 Amine a částice s karboxylovou skupinou – SiMAG-Carboxyl a ProMAG-Carboxyl. U těchto částic bylo v modelovém systému zjišťováno několik charakteristik. Velikost a struktura částic byla analyzována skenovacím elektronovým mikroskopem a dále byla ověřena jejich hydrodynamická velikost pomocí dynamického rozptylu světla. Po imobilizaci modelového proteinu, byla zjištěna vazebná kapacita částic stanovením množství navázaného proteinu testem BCA a měřením enzymové aktivity, a při metodě MELISA bylo hodnoceno chování částic v mikrotitrační destičce v průběhu samotné metody. Ze všech hledisek byly vyhodnoceny jako nejvhodnější nosič pro vazbu A β (1-42) magnetické částice ProMAG-Carboxyl.

Magnetické částice ProMAG-Carboxyl byly pro systém s A β modifikovány pomocí raménka z bisaminoPEGu pro změnu funkční skupiny částic na aminovou (Obrázek 21). Tato modifikace se ukázala být výhodnou a byla proto využita pro stanovení anti-A β autoprotilátek ze séra pacientů. Peptid A β (1-42) byl tedy i s použitím karboxylových magnetických částic vázán díky raménku přes C-konec, a N-konec zůstal přístupný pro vazbu autoprotilátek ze séra. Částice byly pro účely MELISA testu blokovány 1 % BSA, které se ukázalo jako dostačující, a především při modifikaci částic bisaminoPEGem nedošlo při blokaci ke stérické zábraně antigenu (Obrázek 22A). K čemuž nejspíše došlo při blokaci částic s A β (1-42) bez bisaminoPEG raménka (Obrázek 22B).

Při samotném stanovení hladiny autoprotilátek v sérech pacientů metodou MELISA byla paralelně provedena i metoda ELISA. Bylo otestováno celkem 20 patientských sér. I přes vyšší hodnoty absorbancí u slepých vzorků při metodě MELISA byla tato metoda v porovnání s metodou ELISA citlivější. Otázkou je, zda by se citlivost u metody ELISA nezvýšila při menším naředění séra, kde se ale mohou více projevit nespecifické interakce ze séra. U obou metod je mírně patrný trend zvýšených hladin autoprotilátek proti A β (1-42) u normálních sér, a naopak snížených hladin zmíněných protilátek u pacientů

s Alzheimerovou chorobou nebo smíšenou kognitivní chorobou. Ale u takto malého souboru testovaných sér nemůže být tento trend zcela potvrzen.

Závěrem lze říci, že se podařilo optimalizovat metodu MELISA, a to především ve fázi přípravy magnetického nosiče. Metoda MELISA dává hodnoty absorbancí odpovídajících množství anti-A β (1-42) v sérech vyšší než standardní ELISA metoda v mikrotitrační destičce. Předmětem dalších experimentů by mohlo být stanovení anti-A β (1-42) autoprotilátek touto metodou ve větším souboru patientských sér. Také by se mohla do procesu přípravy vzorku zařadit jeho úprava, například vhodná izolace imunoglobulinů, která by snížila nespecifickou sorpci. Do budoucna by se metoda MELISA mohla stát zajímavou alternativou k metodě ELISA pro stanovení anti-A β autoprotilátek.

6. Seznam zkratek

A	absorbance
A β	peptid amyloid beta
ADP	adenosindifosfát (ang. adenosine diphosphate)
AICD	intracelulární fragment APP domény
ACH	Alzheimerova choroba
ALS	amyotrofická laterální skleróza
aMCI	amnestická MCI
APH-1	anterior pharynx-defective 1, podjednotka γ -sekretázy
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
APPs	velký solubilní fragment APP
ATP	adenosintrifosfát (ang. adenosine triphosphate)
B-buňka	B-lymfocyt
BACE1	neuronální β -sekretáza
BCA	bicinchoninová metoda (ang. bicinchoninic acid assay)
BSA	hovězí sérový albumin (ang. bovine serum albumin)
CDK	cyklin-dependentní kináza
CLU	gen pro klusterin
CNS	centrální nervová soustava (ang. central nervous system)
CSF	mozkomíšní mok (ang. cerebrospinal fluid)
CTF	membránový C-terminální fragment
Da	dalton; jednotka velikosti proteinů
DA	dopamin
DEPC	diethyl pyrokarbonát
DLS	dynamický rozptyl světla (ang. dynamic light scattering)
EDAC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein (ang. glial fibrillary acidic protein)

GM1	gangliosid GM1
HRP	křenuv peroxidza (ang. horseradish peroxidase)
HT	hydroxytryptamin
Ig	imunoglobulin
IgG	imunoglobulin třidy G
IgM	imunoglobulin třidy M
IL	interleukin
IVIG	intravenzn imunoglobuliny (ang. intravenous imunoglobulin)
KO	kontroln srum
LDL	lipoproteiny o nızk hustot (ang. low-density lipoprotein)
LOD	limit detekce (ang. limit of detection)
MAPT	protein tau asociovan s mikrotubuly (ang. microtubule associated protein tau)
MCI	mrn kognitivn porucha (ang. mild cognitive impairment)
MELISA	enzymov imunoanalza na magnetickchsticch (ang. magnetic-beads enzym linked immunosorbent assay)
MES	2-(N-Morfolin-4-yl)ethansulfonov kyselina
mRNA	meditorov ribonukleotidov kyselina (ang. messenger ribonucleic acid)
naMCI	neamnestick MCI
OPD	o-fenylendiamin
oxLDL	oxidovan lipoprotein s nızkou hustotou
P3	N-koncov fragment α CTF
PAGE	polyakrylamidov gel
PBS	fosftov pufr s přidavkem soli (ang. phosphate buffered saline)
PDMS	polydimethylsiloxan
PEG	polyethylenglykol
PEN	presenilin
PMMA	polymethylmethakrylt
POC	point-of-care
p-tau	fosforylovan tau protein
PVDF	membrna z polyvinylidendifloridu
RAGE	receptor pro produkty pokroil glykace

RABPT5	protein rabaptin 5
RS	rostroušená skleróza
RT	laboratorní teplota (ang. room temperature)
SD	směrodatná odchylka
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SKP	smíšená kognitivní porucha
SNAP25	presynaptický protein
Sulfo-NHS	N-hydroxysulfosukcinimid sodný
SUPHEPA	N-sukcinil-L-phenylalanin-p-nitroanilid
T-buňka	T-lymfocyt
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TGFβ-2	transformační růstový faktor beta-2
TMB	3,3,5,5-tetramethylbenzidin
TNF-α	faktor nádorové nekrózy (ang. tumor nekrosis factor α)
t-tau	celkový tau protein

7. Seznam použité literatury

- [1] HANSON, J. R. *Chemistry nad Medicines : An Introductory Text*. Royal Society of Chemistry, 2006. **64**, 66 - 67 s. ISBN 978-0-85404-645-4.
- [2] GUPTA, R. C. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Academic Press Inc, 2016. 233 - 234 s. ISBN 978-0-12-802147-7.
- [3] ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 2013, **9**, 270 – 279.
- [4] MAYEUX, R., SCHUPF, N. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: plasma A β 40 and A β 42, and genetic variants. *Neurobiology of Aging*, 2011, **32** (Suppl 1):S10-S19.
- [5] BARNES, D. E., YAFFE, K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *The Lancet Neurology*, 2011, **10**, 819-828.
- [6] CLARK, L. F., KODADEK, T. Advances in blood-based protein biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2013, **5**(3), 18.
- [7] LI, S., HEUREUX, N. L., ELISSEFF, J. *Stem Cell and Tissue Engineering*. World Scientific Publishing Co Pte Ltd, 2011. 321 – 323 s. ISBN 978-981-4317-05-4.
- [8] HOLL, E. M. a PĚKNÝ, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, **32**, 121 – 130.
- [9] KAMPHUIS, W., MIDDELDORP, J., KOOIJMAN, L., aj. Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 2014, **35**, 492 – 510.
- [10] JACK, C. R., KNOPMAN, D. S., JAGUST, W. J., LESLIE, M. S., aj. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology*, 2010, **9**, 119 - 128.
- [11] JIRÁK, R. Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 2008, **9**(4), 240 – 244.
- [12] LOWNDES, G., SAVAGE, G. Early detection of memory impairment in Alzheimer's disease: a neurocognitive perspective on assessment. *Neuropsychology Review*, 2007, **17**, 193 - 202.
- [13] MAYEUX, R., STERN, Y. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2012, **2**(8), a006239.

- [14] MICKES, L., WIXTED, J. T., FENNEMA-NOTESTINE, C., GALASKO, D., aj. Progressive impairment on neuropsychological tasks in a longitudinal study of preclinical Alzheimer's disease. *Neuropsychology*, 2007, **21**, 696 - 705.
- [15] MUFSON, E. J., BINDER, L., COUNTS, S. E., DeKOSKY, S. T., aj. Mild cognitive impairment: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathologica*, 2012, **123**, 13 – 30.
- [16] GIACOBINI, E., GOLD, G. Alzheimer's disease therapy – moving from amyloid- β to tau. *Nature Reviews Neurology*, 2013, **9**, 677 – 686.
- [17] ALBERT, M. S., DeKOSKY, S. T., DICKSON, D., DUBOIS, B., aj. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 2011, **7**(3), 270 – 279.
- [18] McKHANN, G. M., KNOPMANN, D. S., CHERTKOW, H., HYMAN, B. T., aj. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 2011, **7**, 263 – 269.
- [19] SPERLING, R. A., AISEN, P. S., BECKETT, L. A., BENNET, D. A., aj. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 2011, **7**, 280 – 292.
- [20] SWOMLEY, A. M., FÖRSTER, S., KEENEY, J. T., TRIPLETT, J., aj. A β , oxidative stress in Alzheimer disease: Evidence based on proteomics studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, **1842**, 1248 – 1257.
- [21] VOS, S. J., VAN ROSSUM, I. A. VERHEY, F., KNOL, D. L., aj. Prediction of Alzheimer disease in subjects with amnesic and nonamnesic MCI. *Neurology*, 2013, **80**, 1124 – 1132.
- [22] BLENNOW, K., HAMPEL, H., WEINER, M., ZETTERBERG, H. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nature Reveiws Neurology*, 2010, **6**, 131 – 144.
- [23] STROZYK, D., BLENNOW, K., WHITE, L. R., LAUNER, L. J. CSF A β 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology Journals*, 2003, **60**, 652 – 656.
- [24] TAPIOLA, T., ALAFUZOFF, I., HERUKKA, S. K., PARKKINEN, L., aj. Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Archives of Neurology*, 2009, **66**, 382 – 389.

- [25] SHAW, L. M., VANDERSTICHELE, H., KNAPIK-CZAJKA, M., CLARK, C. M., aj.; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Annals of Neurology*, 2009, **65**, 403 – 413.
- [26] VISSER, P. J., VERHEY, F., KNOL, D. L., SCHELTENS, P., aj. Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study. *The Lancet Neurology*, 2009, **8**, 619 – 627.
- [27] TOLEDO, J. B., BRETTSCHEIDER, J., GROSSMAN, M., ARNOLD, S. E., aj. CSF biomarkers cutoffs: The importance of coincident neuropathological diseases. *Acta Neuropathologica*, 2012, **124**, 23 – 35.
- [28] WANG, L. S., LEUNG, Y. Y., CHANG S. K., LEIGHT, S., aj. Comparison of xMAP and ELISA assays for detecting cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, **31**, 439 – 445.
- [29] SCHELTENS, P., BLENNOW, K., BRETELER, M. M. B., De STROOPER, B., aj. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2016, e S0140-6736(15)01124-1.
- [30] DUIJS, F. H., PRINS, N. D., LEMSTRA, A. W., PIJNENBURG, Y. A., aj. Diagnostic impact of CSF biomarkers for Alzheimer's disease in a tertiary memory clinic. *Alzheimer's & Dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 2015, **11**, 523 – 532.
- [31] INGELSSON, M., FUKUMOTO, H., NEWELL, K. L., GROWDON, J. H., aj. Early A β accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *American Academy of Neurology*, 2004, **62**, 925 - 931.
- [32] HENRIKSEN, K., O'BRYANT, S. E., HAMPEL, H., TROJANOWSKI, J. Q., aj. Blood-Based Biomarker Interest Group. The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 2014, **10**, 115 – 131.
- [33] MAPSTONE, M., CHEEMA, A. K., FIANDACA, M. S., ZHONG, X., aj. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nature Medicine*, 2014, **20**, 415 – 418.
- [34] ZETTERBERG, H., WILSON, D., ANDREASSON, U., MINTHON, L., aj. Plasma tau levels in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2013, **5**, 9.
- [35] HARDY, J., SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 2002, **297**(5580), 353 – 356.

- [36] BARD, F., CANNON, C., BARBOUR, R., BURKE, R. L., aj. Peripherally administered anti-bodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Medicine*, 2000, **6**, 916 – 919.
- [37] CLIFFORD, P. M., ZARRABI, S., SIU, G., KINSLER, K. J., aj. A β peptides can enter the brain through a defective blood–brain barrier and bind selectively to neurons. *Brain Research*, 2007, **1142**, 223 - 236.
- [38] D’ANDREA, M. R., LEE, D. H. S., WANG, H. Y., NAGELE, R. G. Targeting intracellular A β 42 for Alzheimer’s disease drug discovery. *Drug Development Research*, 2002, **56**, 194 - 200.
- [39] D’ANDREA, M. R., NAGELE, R. G., WANG, H. Y., PETERSON, P. A., aj. Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer’s disease. *Histopathology*, 2001, **38**, 120 - 134.
- [40] NAGELE, R. G., D’ANDREA, M. R., ANDERSON, W. J., WANG, H. Y. Intracellular accumulation of beta-amyloid (1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer’s disease. *Neuroscience*, 2002, **110**, 199 - 211.
- [41] O’BRIEN, R. J., WONG, P. C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 2011, **34**, 185 – 204.
- [42] ZHENG, H., KOO, E. H. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular Neurodegeneration*, 2006, **1**, 5.
- [43] GRIMM, M. O., HAUPENTHAL, V. J., ROTHHAAR, T. L., ZIMMER, V. C., aj. Effect of different phospholipids on alpha-secretase activity in the non-amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Science*, 2013, **14**, 5879 – 5898.
- [44] BUSS, N. A., HENDERSON, S. J., McFARLANE, M., SHENTON, J. M., aj. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Current Opinion in Pharmacology*, 2012, **12**, 615 – 622.
- [45] BILLNITZER, A. J., BARSKAYA, I., YIN, C., PEREZ, R. G. APP independent and dependent effects on neurite outgrowth are modulated by the receptor associated protein (RAP). *Journal of Neurochemistry*, 2013, **124**, 123 – 132.
- [46] CRUMP, C. J., JOHNSON, D. S., LI, Y. M. Development and mechanism of gamma-secretase modulators for Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 2013, **52**, 3197 - 3216.
- [47] GUSTAFSEN, G., GLERUP, S., PALLESEN, L. T., OLSEN, D., aj. Sortilin and SorLA display distinct roles in processing and trafficking of amyloid precursor protein. *The Journal of Neuroscience*, 2013, **33**, 64 – 71.

- [48] HARTLAGE-RUBSAMEN, M., WANIEK, A., ROSSNER, S. Munc13 genotype regulates secretory amyloid precursor protein processing via postsynaptic glutamate receptors. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2013, **31**, 36 – 45.
- [49] KAMENETZ, F., TOMITA, T., HSIEH, H., SEABROOK, G., aj. APP processing and synaptic function. *Neuron*, 2003, **37**, 925 – 937.
- [50] MARCELLO, E., GARDONI, F., MAUCERI, D., ROMORINI, S., aj. Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. *The Journal of Neuroscience*, 2007, **27**, 1682 – 1691.
- [51] NIKOLAEV, A., McLAUGHLIN, T., O'LEARY, D. D., TESSIER-LAVIGNE, M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*, 2009, **457**, 981 – 989.
- [52] ORTEGA, F., STOTT, J., VISSER, S. A., BENDTSEN, C. Interplay between alpha-, beta-, and gamma-secretases determines biphasic amyloid-beta protein level in the presence of a gamma-secretase inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**, 785 – 792.
- [53] RODRIGUES, E. M., WEISSMILLER, A. M., GOLDSTEIN, L. S. Enhanced beta-secretase processing alters APP axonal transport and leads to axonal defects. *Human Molecular Genetics*, 2012, **21**, 4587 – 4601.
- [54] SUTINEN, E. M., PIRTTILA, T., ANDERSON, G., SALMINEN, A., aj. Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer's disease-associated amyloid-beta production in human neuron-like cells. *Journal of Neuroinflammation*, 2012, **9**, 199.
- [55] VINGTDEUX, V., MARAMBAUD, P. Identification and biology of alpha-secretase, *Journal of Neurochemistry*, 2012, **120**, 34 – 45.
- [56] AHMED, M., DAVIS, J., AUCOIN, D., SSATO, T., aj. Structural conversion of neurotoxic amyloid- β 1-42 oligomers to fibrils. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, **17**, 561-567.
- [57] STEINER, H., FLUHRER, R., HAASS, C. Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, **283**, 29627 – 29631.
- [58] TATE, B., McKEE, T. D., LOUREIRO, R. M., DUMIN, J. A., aj. Modulation of gamma-secretase for the treatment of Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012, 2012, ID 210756.
- [59] YUAN, Z., DU, M., CHEN, Y., DOU, F. Construction of human Fab library and screening of a single-domain antibody of amyloid-beta 42 oligomers. *Neural Regeneration Research*, 2013, **8**, 3107 – 3115.

- [60] PETKOVA, A. T., ISHII, Y., BALBACH, J. J., ANTZUTKIN, O. N., aj. A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2002, **99**, 16742 – 16747.
- [61] McLARNON, J. G. Microglial chemotactic signaling factors in Alzheimer's disease. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 2012, **1**, 199 - 204.
- [62] PATEL, A. N., JHAMANDAS, J. H. Neuronal receptors as targets for the action of amyloid-beta protein (A β) in the brain. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2012, **14**:e2.
- [63] SALMINEN, A., OJALA, J., KAUPPINEN, A., KAARNIRANTA, K., aj. Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid- β oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. *Progress in Neurobiology*, 2009, **87**, 181 - 194.
- [64] WILKINSON, K., EL KHOURY, J. Microglial scavenger receptors and their roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012, **2012**, ID 489456.
- [65] HALDENWANGER, A., ELING, P., KASTRUP, A., HILDEBRANDT, H. Correlation between cognitive impairment and CSF biomarkers in amnesic MCI, non-amnesic MCI, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2010, **22**, 971 – 980.
- [66] LEE, H. G., PERRY, G., MOREIRA, P. I., GARRETT, M. R., aj. Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends in Molecular Medicine*, 2005, **11**, 164 – 169.
- [67] SPILLANTINI, M. G., GOEDERT, M. Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology*, 2013, **12**, 609 – 622.
- [68] POPE, W. B., LAMBERT, M. P., LEYPOLD, B., SEUPAUL, R., aj. Microtubule-associated protein tau is hyperphosphorylated during mitosis in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Experimental neurology*, 1994, **126**, 185 – 194.
- [69] RAINA, A. K., ZHU, X., ROTTKAMP, C. A., MONTEIRO, M., aj. Cyclin' toward dementia: cell cycle abnormalities and abortive oncogenesis in Alzheimer disease. *Journal of Neuroscience Research*, 2000, **61**, 128 – 133.
- [70] ZHU, X., ROTTKAMP, C. A., RAINA, A. K., BREWER, G. J., aj. Neuronal CDK7 in hippocampus is related to aging and Alzheimer disease *Neurobiology of Aging*, **21**, 807 – 813.
- [71] McSHEA, A., WAHL, A. F., SMITH, M. A. Re-entry into the cell cycle: a mechanism for neurodegeneration in Alzheimer disease. *Medical Hypotheses*, 1999, **52**, 525 – 527.

- [72] BALLATORE, C., LEE, V. M., TROJANOWSKI, J. Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 2007, **8**, 663 – 672.
- [73] HERRUP, K., CARRILLO, M. C., SCHENK, D., CACACE, A., aj. Beyond amyloid: getting real about nonamyloid targets in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 2013, **9**, 452– 458.
- [74] STOOHOFF, W., JOHNSON, G. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 280 – 297.
- [75] DANI, M., BROOKS, D. J., EDISON, P. Tau imaging in neurodegenerative disease. *European Journal of Nuclear Medicine Molecular Imaging*, 2016, **43**, 1139 – 1150.
- [76] GARCIA, M. L., CLEVELAND, D. W. Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, **13**(1), 41 – 48.
- [77] ZEMPEL, H., THIES, E., MANDELKOW, E., aj. Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *The Journal of Neuroscience*, 2010, **30**(36), 11938 – 11950.
- [78] MAIRET-COELLO, G., COURCHET, J., PIERAUT, S., aj. The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of A β oligomers through Tau phosphorylation, *Neuron*, 2013, **77**(7), 94 – 108.
- [79] KOVACS, G. G. Invited review: neuropathology of tauopathies: principles and practice. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2015, **41**, 3 – 23.
- [80] RAO, M. V., McBRAYER, M. K., CAMPBELL, J., KUMAR, A., aj. Specific calpain inhibition by calpastatin prevents tauopathy and neurodegeneration and restores normal lifespan in tau P301L mice. *The Journal of Neuroscience*, 2014, **34**, 9222 – 9234.
- [81] HOOVER, B. R., REED, M. N., SU, J., PENROD, R. D., aj. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*, 2010, **68**, 1067 – 1081.
- [82] JADHAV, S., KATINA, S., KOVAC, A., KAZMEROVA, Z., aj. Truncated tau deregulates synaptic markers in rat model for human tauopathy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2015, **9**, 24.
- [83] MAJID, T., ALI, Y. O., VENKITARAMANI, D. V., JANG, M. K., aj. In vivo axonal transport deficits in a mouse model of frontotemporal dementia. *NeuroImage: Clinical*, 2014, **4**, 711 – 717.

- [84] POLYDORO, M., DZHALA, V. I., POOLER, A. M., NICHOLLS, S. B., aj. Soluble pathological tau in the entorhinal cortex leads to presynaptic deficits in an early Alzheimer's disease model. *Acta Neuropathologica*, 2014, **127**, 257 – 270.
- [85] DE CALIGNON, A., POLYDORO, M., SUAREZ-CALVET, M., WILLIAM, C., aj. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron*, 2012, **73**, 685 – 697.
- [86] WU, J. W., HERMAN, M., LIU, L., SIMOES, S., aj. Small misfolded Tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**, 1856 – 1870.
- [87] BRAAK, H., BRAAK, E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiology of Aging*, 1997, **18**, 351– 357.
- [88] BRAAK, H., BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer related changes in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 1991, **82**, 239 – 259.
- [89] PRICE, J., MORRIS, J. Tangles and plaques in nondemented aging and „preclinical“ Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 1999, **45**, 358 – 368.
- [90] JONES, S. E., JOMARY, C. Clusterin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002, **34**, 427 - 431.
- [91] WU, Z. C., YU, J. T., LI, Y., TAN, L. Clusterin in Alzheimer's disease. *Advances in Clinical Chemistry*, 2012, **56**, 155 - 173.
- [92] DABBS, R. A., WYATT, A. R., YERBURY, J. J., ECROYD, H., aj. Extracellular chaperones. *Topics in Current Chemistry*, 2013, **328**, 241 - 268.
- [93] YERBURY, J. J., POON, S., MEEHAN, S., THOMPSON, B., aj. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *The FASEB Journal*, 2007, **21**, 2312 - 2322.
- [94] YU, J. T., TAN, L. The role of clusterin in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis, and therapy. *Molecular Neurobiology*, 2012, **45**, 314 - 326.
- [95] TROUGAKOS, I. P., GONOS, E. S. Clusterin/Apolipoprotein J in human aging and cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002, **34**, 1430 – 1448.
- [96] CALERO, M., ROSTANGO, A., MATSUBARA, E., ZLOKOVIC, B., aj. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microscopy Research and Technique*, 2000, **50**, 305 - 315.
- [97] HAROLD, D., ABRAHAM, R., HOLLINGWORTH, P., SIMS, R., aj. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 2009, **41**, 1088 - 1093.

- [98] LAMBERT, J. C., HEATH, S., EVEN, G., CAMPION, D., aj.; European Alzheimer's Disease Initiative Investigators, DE PANCORBO, M. M., LENDON, C., DUFOUIL, C., JAILLARD, C., aj. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 2009, **41**, 1094 - 1099.
- [99] THAMBISETTY, M., SIMMONS, A., VELAYUDHAN, L., HYE, A., aj. Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease. *Archives of General Psychiatry*, 2010, **67**, 739 - 748.
- [100] SCHRIJVERS, E. M., KOUDSTAAL, P. J., HOFMAN, A., BRETELER, M. M. Plasma clusterin and the risk of Alzheimer disease. *Journal of the American Medical Association*, 2011, **305**, 1322 - 1326.
- [101] OVERK, C. R., MASLIASH, E. Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochemical Pharmacology*, 2014, **88**, 508 – 516.
- [102] HÖLTTÄ, M., HANSSON, O., ANDREASSON, U., HERTZE, J., aj. Evaluating amyloid-beta oligomers in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *PLoS One*, 2013, **8**, e66381.
- [103] YANG, T., HONG, S., O'MALLEY, T., SPERLING, R. A., aj. New ELISAs with high specificity for soluble oligomers of amyloid beta-protein detect natural Aβ oligomers in human brain but not CSF. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 2013, **9**, 99 – 112.
- [104] SAVAGE, M. J., KALININA, J., WOLFE, A., TUGUSHEVA, K., aj. A sensitive abeta oligomer assay discriminates Alzheimer's and aged control cerebrospinal fluid. *The Journal of Neuroscience*, 2014, **34**, 2884 – 2897.
- [105] DIEZ-GUERRA, F. J.. Neurogranin, a link between calcium/calmodulin and protein kinase C signaling in synaptic plasticity. *IUBMB Life*. 2010, **62**, 597 – 606.
- [106] KVARTSBERG, H., DUITTS, F. H., INGELSSON, M., ANDREASEN, N., aj. Cerebrospinal fluid levels of the synaptic protein neurogranin correlates with cognitive decline in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 2015, **11**, 1180 – 1190.
- [107] BRINKMALM, A., BRINKMALM, G., HONER, W. G., FRÖLICH, L., aj. SNAP-25 is a promising novel cerebrospinal fluid biomarker for synapse degeneration in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 2014, **9**, 53.
- [108] D'ANDREA, M. R. Add Alzheimer's disease to the list of autoimmune disease. *Medical Hypotheses*, 2005, **64**, 458 – 463.

- [109] WILD, D. G. *The Immunoassay Handbook*. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. 4. vydání. Elsevier, 2013. Str. 245. ISBN 978-0-08-097037-0. Dostupná z www.knovel.com.
- [110] STRAŠÍK, S. Imunoglobuliny a jejich terapeutické použití. *Praktické lékařství*, 2014, **10** (4), 233 – 237.
- [111] SCHWARTZ, M., BARUCH, K. Breaking peripheral immune tolerance to CNS antigens in neurodegenerative diseases: Boosting autoimmunity to fight-off chronic neuroinflammation. *Journal of Autoimmunity*, 2014, **54**, 8 – 14.
- [112] ELKON, K. B., SILVERMAN, G. J. Naturally occurring autoantibodies to apoptotic cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2012, **750**, 14 - 26.
- [113] LUTZ, H. U. Naturally occurring autoantibodies in mediating clearance of senescent red blood cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2012, **750**, 76 - 90.
- [114] CASALI, P., SCHETTINO, E. W. Structure and function of natural antibodies. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1996, **210**, 167 - 179.
- [115] CHO, J. H., FELDMAN, M. Heterogeneity of autoimmune diseases: pathophysiologic insights from genetics and implications for new therapies. *Nature Medicine*, 2015, **21**(7), 730 - 738.
- [116] WU, J. a LI, L. Autoantibodies in Alzheimer's disease: potential biomarkers, pathogenic roles, and therapeutic implications. *The Journal of Biomedical Research*, 2016, **30**(5), 361 – 372.
- [117] DRACHMANN, D. B. Medical progress: myasthenia gravis. *New England Journal of Medicine*, 1994, **330**, 1797 – 1810.
- [118] CHRISTIDOSS, P., LINDSTROM, J., MUNRO, S., TALAL, N. Muscle acetylcholine receptor loss in murine experimental autoimmune myasthenia gravis: correlated with cellular, humoral, and clinical responses. *Journal of Neuroimmunology*, 1985, **8**, 29 – 41.
- [119] RHODIN, J. A., THOMAS, T. A vascular connection in Alzheimer's disease. *Microcirculation* (New York, N. Y. : 1994), 2001, **8**(4), 207 – 220.
- [120] MAGLIOZZI, R., HOWELL, O., VORA, A., SERAFINI, B., aj. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain : a journal of neurology*, 2007, **130**, 1089 – 1104.
- [121] GRABER, J. J., DHIB-JALBUT, S. Protective autoimmunity in the nervous systém. *Pharmacology & Therapeutics*, 2009, **121**, 147 – 159.

- [1212] BECHER, B., BECHMANN, I., GRETER, M. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 2006, **84**, 532 – 543.
- [123] SCHWARTZ, M., ZIV, Y. Immunity to self and self-maintenance: what can tumor immunology teach us about ALS and Alzheimer's disease? *Trends in Pharmacological Sciences*, 2008, **29**, 287 - 293.
- [124] KIPNIS, J., MIZRAHI, T., YOLES, E., BEN-NUN, A., aj. Myelin specific Th1 cells are necessary for post-traumatic protective autoimmunity. *Journal of Neuroimmunology*, 2002, **130**, 78 - 85.
- [125] SCHWARTZ, M., KIPNIS, J. Autoimmunity on alert: naturally occurring regulatory CD4(+)CD25(+) T cells as part of the evolutionary compromise between a 'need' and a 'risk'. *Trends in Immunology*, 2002, **23**, 530 - 534.
- [126] ZIV, Y., RON, N., BUTOVSKY, O., LANDA, G., aj. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nature Neuroscience*, 2006, **9**, 268 - 275.
- [127] KIPNIS, J., COHEN, H., CARDON, M., ZIV, Y., aj. T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, **101**, 8180 - 8185.
- [128] BEERS, D. R., HENKEL, J. S., ZHAO, W., WANG, J., aj. CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proceedings of National Academy Sciences of the United States of America*, 2008, **105**, 15558 - 15563.
- [129] EITAN, E., TICHON, A., GAZIT, A., GITLER, D., aj. Novel telomerase-increasing compound in mouse brain delays the onset of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Molecular Medicine*, 2012, **4**, 313 - 329.
- [130] CHOU, J. P., EFFROS, R. B. T cell replicative senescence in human aging. *Current Pharmaceutical Design*, 2013, **19**, 1680 - 1698.
- [131] PANOSSIAN, L. A., PORTER, V. R., VALENZUELA, H. F., ZHU, X., aj. Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiology of Aging*, 2003, **24**, 77 - 84.
- [132] BREDESEN, D. E. Neural apoptosis. *Annals of Neurology*, 1995, **38**, 839 – 351.

- [133] THOMAS, T., SUTTON, E. T., BRYANT, M. W., RHODIN, J. A. In vivo vascular damage, leukocyte activation and inflammatory response induced by beta-amyloid. *Journal of Submicroscopic Cytology nad Pathology*, 1997, **29**(3), 293 – 304.
- [134] PLIOPLYS, A. V., THIBAUT, J., BOUCHARD, J-B., COCKBURN, C., aj. Anti-CNS antibodies in neurological and psychiatric disorders. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1987, **50**, 1514 – 1521.
- [135] D’ANDREA, M. R., BELKOWSKI, B. Continual investigations of Ig positive neurons in Alzheimer disease tissues. *Neurobiology of Aging*, 2004, 25(S2): S404.
- [136] EMMERLING, M. R., WATSON, M. D., RUBY, C. A., SPIEGEL, K. The role of complement in Alzheimer’s disease pathology. *Biochemica et Biophysica Acta*, 2000, **1502**, 158 – 171.
- [137] SHECHTER, R., MILLER, O., YOVEL, G., ROSENZWEIG, N., aj. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity*, 2013, **38**, 555 - 569.
- [138] SHECHTER, R., LONDON, A., SCHWARTZ, M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nature Reviews Immunology*, 2013, **13**, 206 - 218.
- [139] MECOCCI, P., PARNETTI, L., REBOLDI, G. P., SANTUCCI, C., aj. Blood–brain barrier in geriatric population: barrier function in degenerative and vascular dementias. *Acta Neurologica Scandinavica*, 1991, **84**, 210 – 213.
- [140] DE LA TORRE, J. C., STEFANO, G. B. Evidence that Alzheimer’s disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide. *Brain Research Reviews*, 2000, **34**, 119 – 136.
- [141] WARDLAW, J. M., SANDERCOCK, P. A. G., DENNIS, M. S., STARR, J. Is breakdown of the blood–brain barrier responsible for lacunar stroke, leukoaraiosis, and dementia? *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2003, **34**(3), 806 – 812.
- [142] HOFMAN, A., OTT, A., BRETELER, M. M., BOTS, M. L., aj. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia, and Alzheimer’s disease in the Rotterdam study. *Lancet*, 1997, **349**, 151 – 154.
- [143] FULLERTON, S. M., SHIRMAN, G. A., STRITTMATTER, W. J., MATTHEW, W. D. Impairment of the blood–nerve and blood–brain barriers in apolipoprotein E knockout mice. *Experimental Neurology*, 2001, **169**, 13 – 22.

- [144] FARKAS, E., DE JONG, G. I., DE VOS, R. A., JANSEN STEUR, E. N., aj. Pathological features of cerebral cortical capillaries are doubled in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 2000, **100**, 395 – 402.
- [145] MOORANDIAN, A. D. Effect of aging on the blood–brain barrier. *Neurobiology of Aging*, 1998, **9**, 31 – 39.
- [146] GOMEZ-ISLA, T., WEST, H. L., REBECK, G. W., HARR, S. D., aj. Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E ϵ 4 in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 1996, **39**, 62 – 70.
- [147] MATTILA, K. M., PIRTILA, T., BLENNOW, K., WALLIN, A., aj. Altered blood–brain barrier function in Alzheimer's disease? *Acta Neurologica Scandinavica*, 1994, **89**, 192 – 198.
- [148] D'ANDREA, M. R. Evidence linking neuronal cell death to autoimmunity in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 2003, **982**, 19 - 30.
- [149] COLASANTI, T., BARBATI, C., ROSANO, G., MALORNI, W., aj. Autoantibodies in patients with Alzheimer's disease: pathogenetic role and potential use as biomarkers of disease progression. *Autoimmunity Reviews*, 2010, **9**, 807 – 811.
- [150] WEINER, H. L., SELKOE, D. J. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. *Nature*, 2002, **420**, 879 – 884.
- [151] SELKOE, D. J. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, **924**, 17 – 25.
- [152] SILACCI, M., BRACK, S., SCHIRRU, G., MARLIND, J., aj. Design, construction, and characterization of a large synthetic human antibody phage display library. *Proteomics*, 2005, **5**, 2340 – 2350.
- [153] HARDY, J. Has the amyloid cascade hypothesis for AD been proved? *Current Alzheimer Research*, 2006, **3**, 71 – 73.
- [154] SZABO, P., RELKIN, N., WEKSLER, M. E. Natural human antibodies amyloid beta peptide. *Autoimmunity reviews*, 2008, **7**, 415 – 420.
- [155] TAGUCHI, H., PLANQUE, S., NISHIYAMA, Y., SZABO, P., aj. Catalytic antibodies to amyloid beta peptide in defense against Alzheimer disease. *Autoimmunity Reviews*, 2008, **7**, 391 – 397.
- [156] QU, B.-X., GONG, Y., MOORE, C., FU, M., aj. Beta-amyloid auto-antibodies are reduced in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology*, 2014, **274**, 168 – 173.

- [157] McLAURIN, J., CECAL, R., KIERSTEAD, M. E., TIAN, X., aj. Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4–10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nature Medicine*, 2002, **8**, 1263 – 1269.
- [158] DODEL, R., BALAKRISHNAN, K., KEYVANI, K., DEUSTER, O., aj., Naturally Occurring Autoantibodies against β -Amyloid: Investigating Their Role in Transgenic Animal and In *Vitro* Models of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 2011, **31**(15), 5847 – 5854.
- [159] BRETTSCHEIDER, S., MORGENTHALER, N. G., TEIPEL, S. J., FISCHER-SCHLUZ, C., aj. Decreased serum amyloid beta(1–42) autoantibody levels in Alzheimer's disease, determined by a newly developed immuno-precipitation assay with radiolabeled amyloid beta(1–42) peptide. *Biological Psychiatry*, 2005, **57**, 813 – 816.
- [160] SONG, M., MOOK-JUNG, I., LEE, H., MIN, J., aj. Serum anti-amyloid-beta antibodies and Alzheimer 's disease in elderly Korean patients. *The Journal of Interantional Medical Research*, 2007, **35**, 301 – 306.
- [161] WEKSLER, M. E., RELKIN, N., TURKENICH, R., LARUSSE, S., aj. Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Experimental Gerontology*, 2002, **37**, 943 – 948.
- [162] MRUTHINTI, S., BUCCAFUSCO, J. J., HILL, W. D., WALLER, J. L., aj. Autoimmunity in Alzheimer's disease: increased levels of circulating IgGs binding Abeta and RAGE peptides. *Neurobiology of Aging*, 2004, **25**, 1023 – 1032.
- [163] HYMAN, B. T., SMITH, C., BULDYREV, I., WHELAN, C., aj. Autoantibodies to amyloid-beta and Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 2001, **49**, 808 – 810.
- [164] DU, Y., DODEL, R., HAMPEL, H., BUERGER, K., aj. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology*, 2001, **57**, 801 – 805.
- [165] BARIL, L., NICHOLAS, L., CROISILE, B., CROZIER, P., aj. Immune response to Abeta-peptides in peripheral blood from patients with Alzheimer's disease and control subjects. *Neuroscience Letters*, 2004, **355**, 226 – 230.
- [166] GUSTAW, K. A., GARRETT, M. R., LEE, H.-G., CASTELLANI, R. J., aj. Antigen-antibody dissociation in Alzheimer disease: a novel approach to diagnosis. *Journal of Neurochemistry*, 2008, **106**, 1350 – 1356.
- [167] GUSTAW-ROTHENBERG, K., SIEDLAK, S., BONDA, D., aj. Dissociated amyloid-beta antibody levels as a serum biomarker for the progression of Alzheimer's disease: A population-based study. *Experimental Gerontoogy*, 2010, **45**, 47 – 52.

- [168] KLAVER, A C., COFFEY, M. P., SMITH, L. M., BENNETT, D. A., aj. ELISA measurement of specific non-antigen-bound antibodies to Abeta 1–42 monomer and soluble oligomers in sera from Alzheimer's disease, mild cognitively impaired, and noncognitively impaired subjects. *Journal of Neuroinflammation*, 2011, **8**:93.
- [169] KOTILINEK, L. A., BACSKAI, B., WESTERMAN, M., KAWARABAYASHI, T., aj. Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 2002, **22**, 6331 – 6335.
- [170] MORGAN, D., DIAMOND, D. M., GOTTSCHALL, P. E., UGEN, K. E., aj. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*, 2000, **408**, 982 – 985.
- [171] BONCORAGLIO, G. B., PIAZZA, F., SAVOIRADO, M., FARINA, L., aj. Prodromal Alzheimer's disease presenting as cerebral amyloid angiopathy-related inflammation with spontaneous amyloid-related imaging abnormalities and high cerebrospinal fluid anti-Abeta autoantibodies. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2015, **45**(2), 363 - 367.
- [172] PIAZZA, F., GREENBERG, S. M., SAVOJARDO, M., GARDINETTI, M., aj. Anti-amyloid beta autoantibodies in cerebral amyloid angiopathy-related inflammation: implications for amyloid-modifying therapies. *Annals of Neurology*, 2013, **73**(4), 449 - 458.
- [173] SPERLING, R. A., JACK, C. R., BLACK, S. E., FROSCHE, M. P., aj. Amyloid-related imaging abnormalities (ARIA) in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimer's & Dementia*, 2011, **7**(4), 367 - 385.
- [174] DODEL, R. C., DU, Y., DEPBOYLU, C., HAMPEL, H., aj. Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 2004, **75**, 1472 – 1474.
- [175] GEYLIS, V., STEINITZ, M. Immunotherapy of Alzheimer's disease (AD): from murine models to anti-amyloid beta (Abeta) human monoclonal antibodies. *Autoimmunity Reviews*, 2006, **5**, 33 – 39.
- [176] TERRYBERRY, J. W., THOR, G., PETER, J. B. Autoantibodies in neurodegenerative diseases: antigen-specific frequencies and intrathecal analysis. *Neurobiology of Aging*, 1998, **19**(3), 205 - 216.
- [177] ROSENMAN, H., MEINER, Z., GEYLIS, V., ABRAMSKY, O., aj. Detection of circulating antibodies against tau protein in its unphosphorylated and in its neurofibrillary tangles-related phosphorylated state in Alzheimer's disease and healthy subjects. *Neuroscience Letters*, 2006, **410**, 90 – 93.

- [178] GOLD, M., PUL, R., BACH, J.-P., STANGEL, M., aj. Pathogenic and physiological autoantibodies in the central nervous system. *Immunological Reviews*, 2012, **248**, 68 – 86.
- [179] BOUTAJANGOUT, A., INGADOTTIR, J., DAVIES, P., SIGURDSSON, E. M. Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain. *Journal of Neurochemistry*, 2011, **118**(4), 658 - 667.
- [180] RATNER, M. Biogen's early Alzheimer's data raise hopes, some eyebrows. *Nature Biotechnology*, 2015, **33**(5), 438.
- [181] BUTTERFIELD, D. A., LAUDERBACK, C. M. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002, **32**, 1050 – 1060.
- [182] BASSETT, C. N., NEELY, M. D., SIDELL, K. R., MARKESBERY, W. R., aj. Cerebrospinal fluid lipoproteins are more vulnerable to oxidation in Alzheimer's disease and are neurotoxic when oxidized ex vivo. *Lipids*, 1999, **34**, 1273 – 1280.
- [183] BINDER, C. J., HÖRKKÖ, S., DEWAN, A., CHANG, M., aj. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nature Medicine*, 2003, **9**, 736 – 743.
- [184] KANKAANPÄÄ, J., TURUNEN, S. P., MOILANEN, V., HÖRKKÖ, S., aj. Cerebrospinal fluid antibodies to oxidized LDL are increased in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 2009, **33**, 467 – 472.
- [185] KAKIO, A., NISHIMOTO, S., YANAGISAWA, K., KOZUTSUMI, Y., aj. Interactions of amyloid beta-protein with various gangliosides in raft-like membranes: importance of GM1 ganglioside-bound form as an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *Biochemistry*, 2002, **41**, 7385 – 7390.
- [186] MANDAL, P. K., PETTERGREW, J. W. Alzheimer's disease: NMR studies of asialo (GM1) and trisialo (GT1b) ganglioside interactions with Abeta (1–40) peptide in a membrane mimic environment. *Neurochemical Research*, 2004, **29**, 447 – 453.
- [187] HATZIFILIPPOU, E., KOUTSOURAKI, E., BANAKI, T., TRAKA, M., aj. Antibodies against GM1 in demented patients. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 2008, **23**, 274 – 279.
- [188] DAVYDOVA, T. V., VOSKRESENSKAYA, N. I., FOMINA, V. G., VETRILE, L. A., aj. Induction of autoantibodies to glutamate in patients with Alzheimer's disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2007, **143**, 182 – 183.

- [189] GRUDEN, M. A., DAVIDOVA, T. B., MALISAUSKAS, M., SEWELL, R. D., aj. Differential neuroimmune markers to the onset of Alzheimer's disease neurodegeneration and dementia: autoantibodies to A β ₍₂₅₋₃₅₎ oligomers, S100b and neurotransmitters. *Journal of Neuroimmunology*, 2007, **186**, 181 – 192.
- [190] ALISKY, J. M. Neurotransmitter depletion may be a cause of dementia pathology rather than an effect. *Medical Hypotheses*, 2006, **67**, 556 – 560.
- [191] STEINER, J., BOGERTS, B., SCHROETER, M. L., BERNSTEIN, H. G. S100B protein in neurodegenerative disorders. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011, **49**(3), 409 - 424.
- [192] HEIZMANN, C. W., FRITZ, G., SCHÄFER, B. W. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Frontiers in Bioscience : a journal and virtual library*, 2002, **7**, 1356 – 1368.
- [193] PETZOLD, A., KEIR, G., LIM, D., SMITH, M., aj. Cerebrospinal fluid (CSF) and serum S100B: release and wash-out pattern. *Brain Research Bulletin*, 2003, **61**, 281 – 285.
- [194] MECOCCI, P., PARNETTI, L., ROMANO, G., SCARELLI, A., aj. Serum anti-GFAP and anti-S100 autoantibodies in brain aging, Alzheimer's disease and vascular dementia. *Journal of Neuroimmunology*, 1995, **57**(1-2), 165 - 170.
- [195] MOR, F., IZAK, M., COHEN, I. R. Identification of aldolase as a target antigen in Alzheimer's disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2005, **175**, 3439 – 3445.
- [196] DELUNARDO, F., MARGUTTI, P., PONTECORVO, S., COLASANTI, T., aj. Screening of a microvascular endothelial cDNA library identifies rabaptin 5 as a novel autoantigen in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology*, 2007, **192**, 105 – 112.
- [197] NIXON, R. A. Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Neurobiologz of Aging*, 2005, **26**, 373 – 382.
- [198] DEANE, R., DU YAN, S., SUBMAMARYAN, R. K., LaRUE, B., aj. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nature Medicine*, 2003, **9**(7), 907 - 913.
- [199] MITCHELL, M. B., BUCCAFUSCO, J. J., SCHADE, R. F., WEBSTER, S. J., aj. RAGE and Abeta immunoglobulins: relation to Alzheimer's diseaserelated cognitive function. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 2010, **16**(4), 672 - 678.
- [200] MRUTHINTI, S., SCHADE, R. F., HARRELL, D. U., GULATI, N. K., aj. Autoimmunity in Alzheimer's disease as evidenced by plasma immunoreactivity against RAGE and Abeta42: complication of diabetes. *Current Alzheimer Research*, 2006, **3**, 229 – 235.

- [201] VACIRCA, D., DELUNARDO, F., MATARRESE, P., COLASANTI, T., aj. Autoantibodies to the ATP synthase play a pathogenetic role in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 2012, **33**(4), 753 - 766.
- [202] BOYER, P. Molecular motors: What makes ATP synthase spin? *Nature*, 1999, **402**, 247 – 249.
- [203] McINTYRE, J. A., HAMILTON, R. L., DeKOSKY, S. T. Redox-reactive autoantibodies in cerebrospinal fluids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, **1109**, 296 – 302.
- [204] McINTYRE, J. A., CHAPMAN, J., SHAVIT, E., HAMILTON, R. L., aj. Redox-reactive autoantibodies in Alzheimer's patients' cerebrospinal fluids: preliminary studies. *Autoimmunity*, 2007, **40**, 390 – 396.
- [205] KLAVER, A. C., PATRIAS, L. M., COFFEY, M. P., FINKE, J. M., aj. Measurement of anti-A β 1-42 antibodies in intravenous immunoglobulin with indirect ELISA: The problem of nonspecific binding. *Journal of Neuroscience Methods*, 2010, **180**, 263 – 269.
- [206] SONG, F., ZHOU, Y., LI, Y. S., MENG, X. M., aj. A rapid immunomagnetic beads-based immunoassay for the detection of β -casein in bovine milk. *Food Chemistry*, 2014, **158**, 445 – 448.
- [207] KOURILOV, V., STEINITZ, M. Magnetic-bead enzyme-linked immunosorbent assay verifies adsorption of ligand and epitope accessibility. *Analytical Biochemistry*, 2002, **311**, 166 – 170.
- [208] MAO, C. L., ZIENTEK, K. D., COLAHAN, P. T., KUO, M. Y., aj. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for fentanyl and applications of fentanyl antibody-coated nanoparticles for sample preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, **41**(4), 1332 - 1341.
- [209] WANG, Y.-K., WANG, Y.-C., WANG, H., JI, W.-H., aj. An immunomagnetic-bead-based enzyme-linked immunosorbent assay for sensitive quantification of fumonisin B1. *Food Control*, 2014, **40**, 41 – 45.
- [210] KISELEV, M. V., GLADILIN, A. K., MELIK-NUBAROV, N. S., P.G. Sveshnikov, aj. Determination of cyclosporin A in 20% ethanol by a magnetic beads-based immunofluorescence assay. *Analytical Biochemistry*, 1999, **269**(2), 393 – 398.
- [211] SAO, H., KITAORI, K., KASAI, M., SHIMOKAWA, T., aj. A new marrow T cell depletion method using anti-CD 6 monoclonal antibody-conjugated magnetic beads and its clinical application for prevention of acute graft-vs-host disease. *International Journal of Hematology*, 1999, **69**(1), 27 – 35.

- [212] PHILIPPOVA, O., BARABANOVA, A., MOLCHANOV, V., KHOKHLOV, A. Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in sythetic design and application. *European Polymer Journal*, 2011, **47**, 542 – 559.
- [213] SCHMIDT, A. M. Thermoresponsive magnetic colloids. *Colloid and Polymer Science*, 2007, **285**, 953 – 966.
- [214] VEISEH, O., GUNN, J. W., ZHANG, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advances Drug Delivery Reviews*, 2010, **62**(3), 284 – 304.
- [215] LAURENT, S., FORGE, D., PORT, M., ROCH, A., aj. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews*, 2008, **108**(6), 2064 – 2110.
- [216] SAFARIK, I. a SAFARIKOVA, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology*, 2004, **2**:7.
- [217] RUFFERT, CH. Magnetic beads-Magic bullet. *Micromachines*, 2016, **7**, 21.
- [218] HU, Y., SHEN, G., ZHU, H., JIANG, G. A class-specific enzyme-linked immunosorbent assay based on magnetic particles for multiresidue organophosphorus pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, **58**(5), 2801 - 2806.
- [219] SOH, N., NISHIYAMA, H., ASANO, Y., IMATO, T., aj. Chemiluminescence sequential injection immunoassay for vitellogenin using magnetic microbeads. *Talanta*, 2004, **64**, 1160 – 1168.
- [220] TETSE, B., VIAL, J., DESCROIX, S., GEORGELIN, T., aj. A chemometric approach for optimizing protein covalent immobilization on magnetic core-shell nanoparticles in view of an alternative immunoassay. *Talanta*, 2010, **81**, 1703 – 1710.
- [221] GUESDON, J. L., AVRAMEAS, S. Magnetic solid-phase enzyme immunoassay for the quantitation of antigens and antibodies: application to human immunoglobulin E. *Methods in Enzymology*, 1981, **73**, 471 – 482.
- [222] ALBRETSEN, C., KALLAND, K.-H., HAUKANES, B.-I., HAVARSTEIN, L. S., KLEPPE, K. Applications of magnetic beads with covalently attached oligonucleotides in hybridization: isolation and detection of specific measles virus mRNA from a crude cell lysate. *Analytical Biochemistry*, 1990, **189**(1), 40 – 50.
- [223] VARDTAL, F., GAUDERNACK, G., FUNDERUD, S., BRATLIE, A., aj. HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation – a fast and reliable technique. *Tissue Antigens*, 1986, **28**(5), 301 – 312.

- [224] SAFARIK, I. a SAFARIKOVA, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1999, **722**(1 - 2), 33 - 53.
- [225] DILER, E., OBST, U., SCHMITZ, K., SCHWARTZ, T. A lysozyme and magnetic bead based method of separating intact bacteria. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, **401**(1), 253 – 265.
- [226] HOLSCHUH, K., SCHWÄMMLE, A. Preparative purification of antibodies with protein A-an alternative to conventional chromatography. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, **293**(1), 345 - 348.
- [227] DJOUMERSKA, I., TCHORBANOV, A., PASHOV, A., VASSILEV, T. The autoreactivity of therapeutic intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations depends on the fractionation methods used. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2005, **61**(4), 357 – 363.
- [228] DIMITROV, J. D., LACROIX-DESMAZES, S., KAVERI, S. V., VASSILEV, T. L. Transition towards antigen-binding promiscuity of a monospecific antibody. *Molecular Immunology*, 2007, **44**(8), 1854 – 1863.
- [229] BOUVET, J. P., STAHL, D., ROSE, S., QUAN, C. P., aj. Induction of natural autoantibody activity following treatment of human immunoglobulins with dissociating agents. *Journal of Autoimmunity*, 2001, **16**, 163 – 172.
- [230] LI, Q., GORDON, M., CAO, C., UGEN, K. E., aj. Improvement of a low pH antigen-antibody dissociation procedure for ELISA measurement of circulating anti-A β antibodies. *BMC Neuroscience*, 2007, **8**, 1 - 11.
- [231] DEN DULK, R. C, SCHMIDT, K. A., SABATTÉ, G., LIÉBANA, S., aj. Magneto-capillary valve for integrated purification and enrichment of nucleic acid and proteins. *Lab on a Chip*, 2013, **13**, 106 - 118.
- [232] PARK, H., HWANG, M. P., LEE, K. H. Immunomagnetic nanoparticle-based assays for detection of biomarkers. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, **8**, 4543 - 4552.
- [233] ZHANG, R. Q., LIU, S. L., ZHAO, W., ZHANG, W. P., aj. A simple point-of-care microfluidic immunomagnetic fluorescence assay for pathogens. *Analytical chemistry*, 2013, **85**(5), 2645 - 2651.
- [234] LIM, C. T., ZHANG, Y. Bead-based microfluidic immunoassays: The next generation. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, **22**(7), 1197 - 1204.
- [235] ROSSIER, J. S., GIRAULT, H. H. Enzyme linked immunosorbent assay on a microchip with electrochemical detection. *Lab on a Chip*, 2001, **1**, 153 - 157.

- [236] KIM, J. A., KIM, M., KANG, S. M., LIM, K. T., aj. Magnetic bead droplet immunoassay of oligomer amyloid β for the diagnostic of Alzheimer's disease using micro-pillars to enhance the stability of the oil-water interface. *Biosensors and Bioelectronic*, 2015, **67**, 724 - 732.
- [237] NAGELE, E., HAN, M., DEMARSHALL, C., aj. Diagnosis of Alzheimer's disease based on disease-specific autoantibody profiles in human sera. *PLoS One*, 2011, **6**(8), e23112.
- [238] NAGELE, E. P., HAN, M., ACHARYA, N. K., DeMARSHALL, C., aj. Natural IgG auto-antibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS One*, 2013, **8**(4), e60726.
- [239] HORÁK, D., SVOBODOVÁ, Z., AUTEBERT, J., COUDERT, B., aj. Albumin-coated monodisperse magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres with immobilized antibodies: Application to the capture of epithelial cancer cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2013, **101A**(1), 23 – 32.
- [240] MEDEIROS, S. F., SANTOS, A. M., FESSI, H., ELAISSARI, A. Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, **403**(1-2), 193 – 161.
- [241] KRULIŠOVÁ, P. Zavedení ELISA metody na magnetických částicích pro průkaz specifických protilátek proti biomarkerům Alzheimerovi choroby. Pardubice, 2013. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Mgr. Barbora Jankovičová.
- [242] HERMANSON, G. T. Bioconjugate Techniques, 3. vydání. Amsterdam: Elsevier, 2013. Str. 229 – 258.
- [243] KUČEROVÁ, J., SVOBODOVÁ, Z., KNOTEK, J., PALARCIK, J. PEGylation of magnetic poly(glycidyl methacrylate) microparticles for microfluidic bioassays. *Materials Sciences and Engineering C*, 2014, **40**, 308 – 315.
- [244] NAGASAKI, Y., KOBAYASHI, H., KATSUYAMA, Y., JOMURA, T, aj. Enhanced immunoresponse of antibody/mixed-PEG co-immobilized surface construction of high-performance immunomagnetic ELISA system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, **309**(2), 524 - 530.
- [245] WIECHELMAN, K. J., BRAUN, R. D., FITZPATRICK, J. D. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 1988, **175**, 231 – 237.
- [246] WALKER, J. M. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology*, 1994, **32**, 5 – 8.

- [247] NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 1988, **9**, 255 – 262.
- [248] SWITZER, R. C., MERRIL, C. R., SHIFRIN, S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1979, **98**(1), 231 – 237.
- [269] SVOBODOVA, Z., KUCEROVA, J., AUTENERT, J., HORAK, D., aj. Application of an improved magnetic immunosorbent in an Ephesia chip designed for circulating tumor cell capture. *Electrophoresis*, 2014, **35**, 323 – 329.
- [270] BARD, F., BARBOUR, R., CANNON, C., CARRETTO, R., aj. Epitope and isotype specificities of antibodies to β -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, **100**(4), 2023 – 2028.

8. Seznam internetových zdrojů

- [249] DVOŘÁK, K. *Reaktivní a dystrofické změny tkáně CNS* [online]. [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: < https://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl_cz/main+cnspatol+reakcecons.html >.
- [250] AGAMANOLIS, D. P. [online] Neuropathology, an illustrated interactive course for medical students and residents – Alzheimer disease, 2014 [cit. 2016-06-13]. Dostupné z < <http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9bAD.html> >.
- [251] MODERN SCIENCE CLUB. *Protein linked to longevity and enhanced cognition protects against Alzheimer's symptoms* [online]. [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: < <http://modernscienceclubp.wixsite.com/modern-science-club/single-post/2015/02/11/Protein-linked-to-longevity-and-enhanced-cognition-protects-against-Alzheimers-symptoms> >.
- [252] BENHAR, I., LONDON, A., SCHWARTZ, M. *The privileged immunity of immune privileged organs: the case of the eye* [online]. [cit. 2017-04-04]. *Frontiers in Immunology*, 2012, **3**: 296. Dostupné z: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3448293/> >.
- [253] THERMO FISHER SCIENTIFIC. Thiophilic Adsorbent Resin and Kit [online]. [2017-04-27]. Dostupné z : < <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=01010326> >.
- [254] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *ELISA technical guide and protocols, TECH TIP # 65*. [cit. 2017-02-15]. Dostupné z: < <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf> >.
- [255] STEJSKAL, V. *Bioanalytické metody pro hodnocení bezpečnosti zemědělských surovin a produktů* [online]. [cit. 2017-05-01]. Dostupný z: < <http://www.phytoanalytik.org/projekty/2008/Projekt2.pdf> >.
- [256] PHARMAINFO.NET, Pharmaceutical Information, Articles and Blogs. *Zeta Potential for measurement of stability of nanoparticles* [online]. [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: < <http://www.pharmainfo.net/book/emerging-trends-nanotechnology-pharmacy-physicochemical-characterization-nanoparticles/zeta> >.
- [257] ZETA-METER INC. *Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes* [online]. [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: < <http://www.zeta-meter.com/downloads.html> >.
- [258] ELVEFLOW plug & play microfluidics. *Microfluidics: A general overview of microfluidics* [online]. [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: < <http://www.elflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/microfluidics/> >.
- [259] ELVEFLOW plug & play microfluidics. *Microfluidics and microfluidic devices: A review* [online]. [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: < <http://www.elflow.com/microfluidic->

[tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/microfluidics-and-microfluidic-device-a-review/](https://www.micromod.de)
>.

[260] MICROMOD. *Partikeltechnologie GmbH* [online]. [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: < www.micromod.de >.

[261] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Carbodiimide Crosslinker Chemistry* [online]. [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: < <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html> >.

[262] ANGSTROM SCIENTIFIC, Inc. *JEOL 5600LV SEM* [online]. [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: < <http://www.angstrom.us/jeol-5600lv-sem> >.

[263] LAYSAN BIO, Inc. *Products – NH2-PEG-CM, MW 3,400* [online]. [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: < http://laysanbio.com/index.php?src=directory&view=products&submenu=Products&category=NH2-COOH-3400&query=category.eq.NH2-COOH-3400&refno=323&srctype=products_detail >.

[264] AMIDEBIO, Application note #101. *Quantification of A β 42* [online]. [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: < http://www.amidebio.com/wp-content/uploads/2016/07/Application_Note.pdf >.

[265] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Description Pierce Silver Stain Kit* [online]. [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: < <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/24612> >.

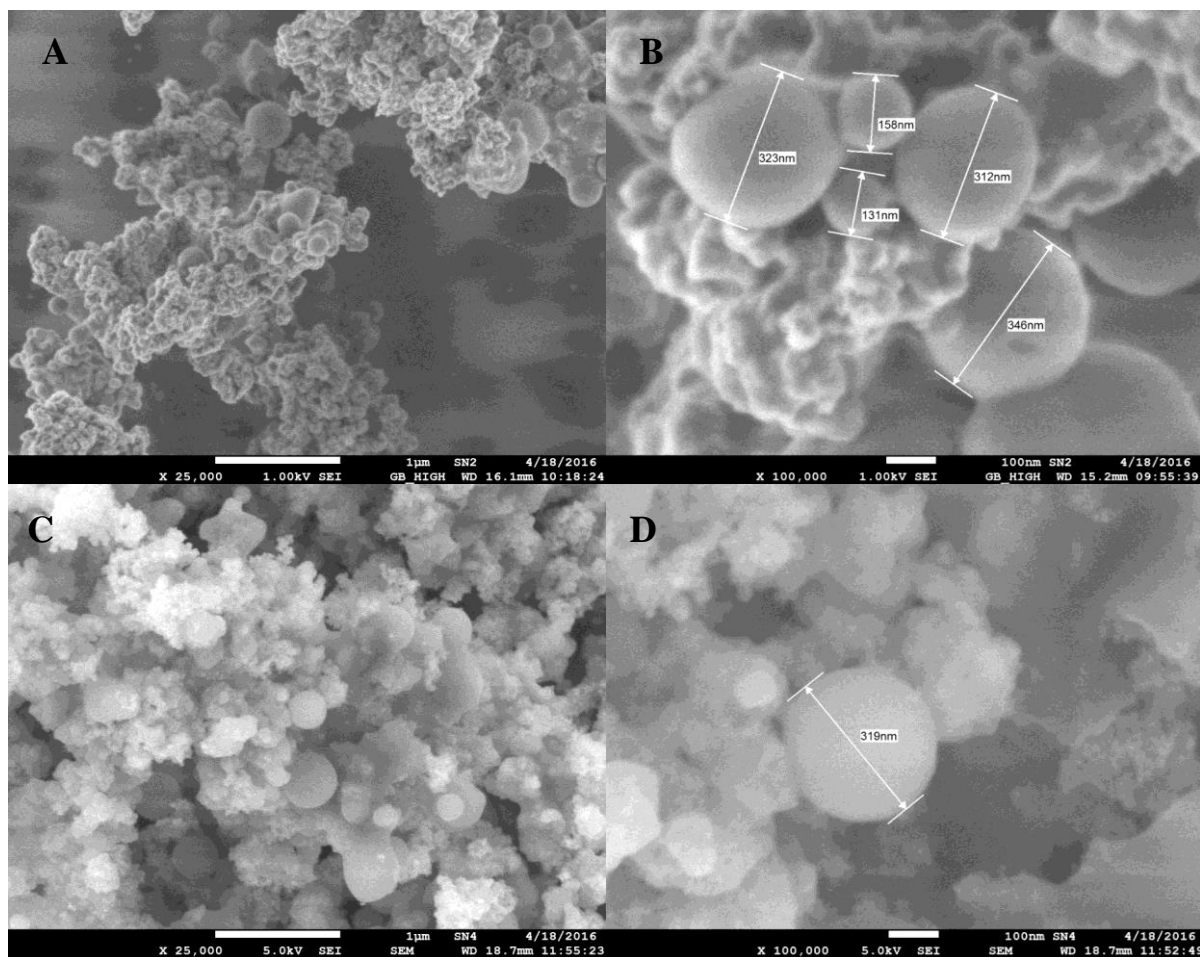
[267] Požadavky kladené na analytické výsledky. *Matematicko statistické parametry analytických výsledků* [online]. [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: < <https://web.vscht.cz/~poustkaj/APPP%20Matematicko%20statisticke%20parametry%20122012.pdf> >.

[268] BIOMAGNETIC SEPARATION. *Application of magnetic nano- and microparticles in biosciences* [online]. [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: < http://www.chemicell.com/products/magnetic_particles/magnetic_particle_separation.html >.

[270] LAB GUIDE průvodce laboratoří. *Western blot* [online]. [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: < <http://labguide.cz/metody/western-blot/> >.

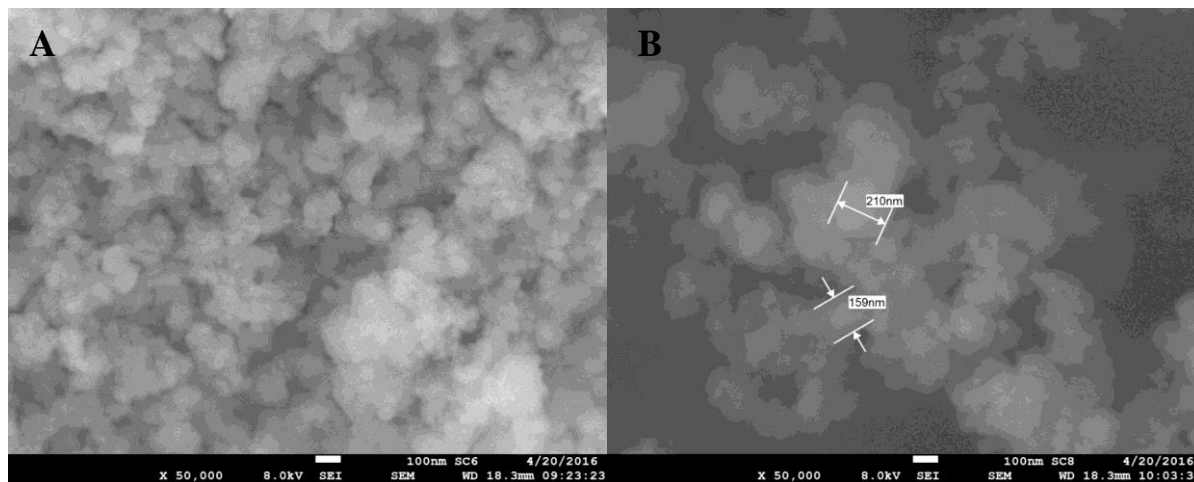
9. PŘÍLOHY

9.1. Příloha A - SiMAG-Amine (Chemicell, Berlín, Německo, průměr: 1 μm)



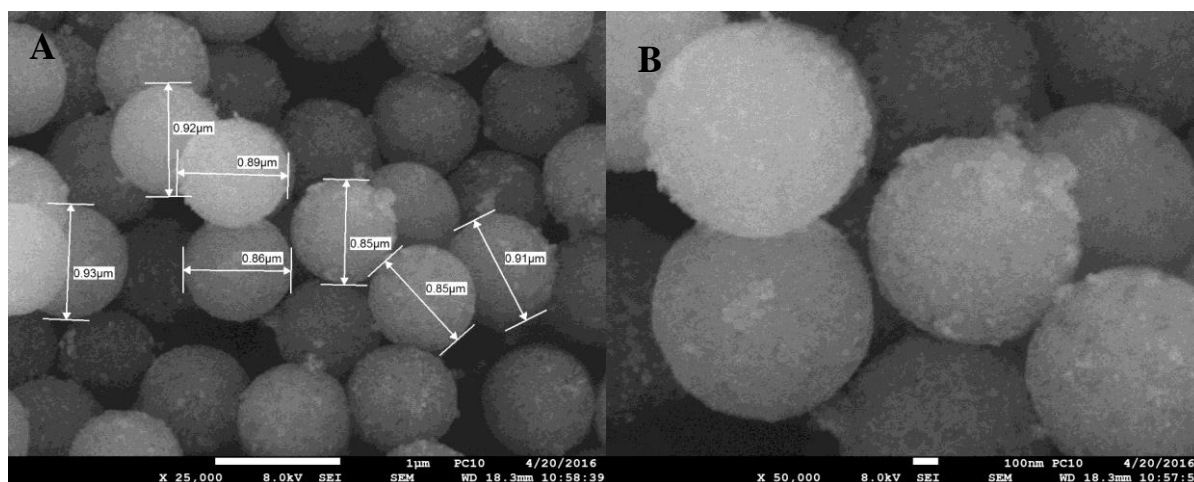
Obrázek 24 Čisté magnetické částice SiMAG-Amine, sušené při 37 °C (obr. A, B). Magnetické částice SiMAG-Amine a vázaným enzymem, sušené při 37°C (obr. C, D). A - zvětšeno 25 000x; B - zvětšeno 100 000x; C – zvětšeno 25 000x; D – zvětšeno – 100 000x.

9.2. Příloha B - SiMAG-Carboxyl (Chemicell, Berlín, Německo, průměr: 1 μm)

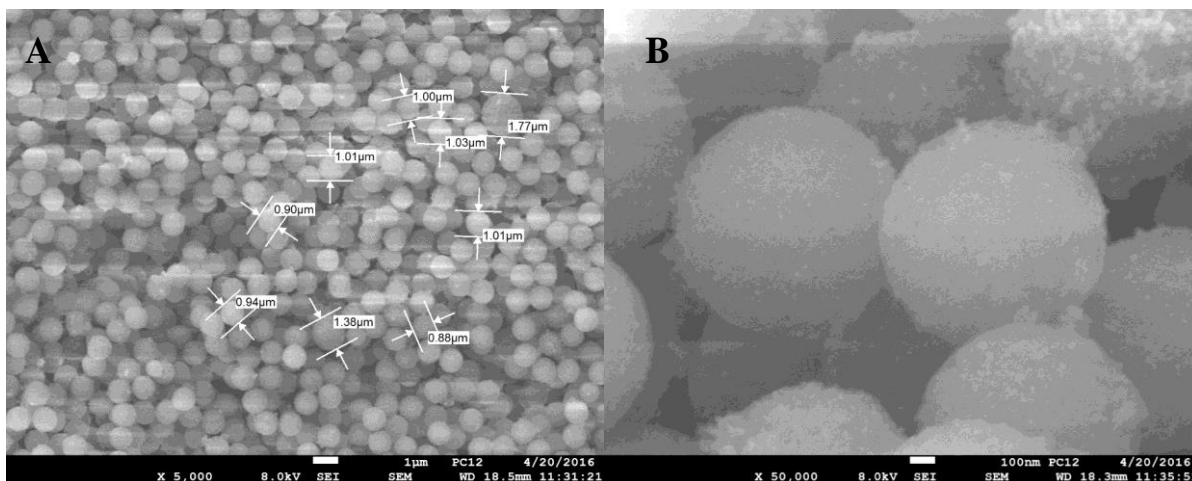


Obrázek 25 A - Čisté magnetické částice SiMAG-Carboxyl, sušené při 37 °C. Zvětšeno 50 000x. B - Magnetické částice SiMAG-Carboxyl s vázaným enzymem, sušené při 37°C. Zvětšeno 50 000x.

9.3. Příloha C - ProMAG-Carboxyl (Bangs Laboratories, Indiana, USA, průměr: 0,8 μm)

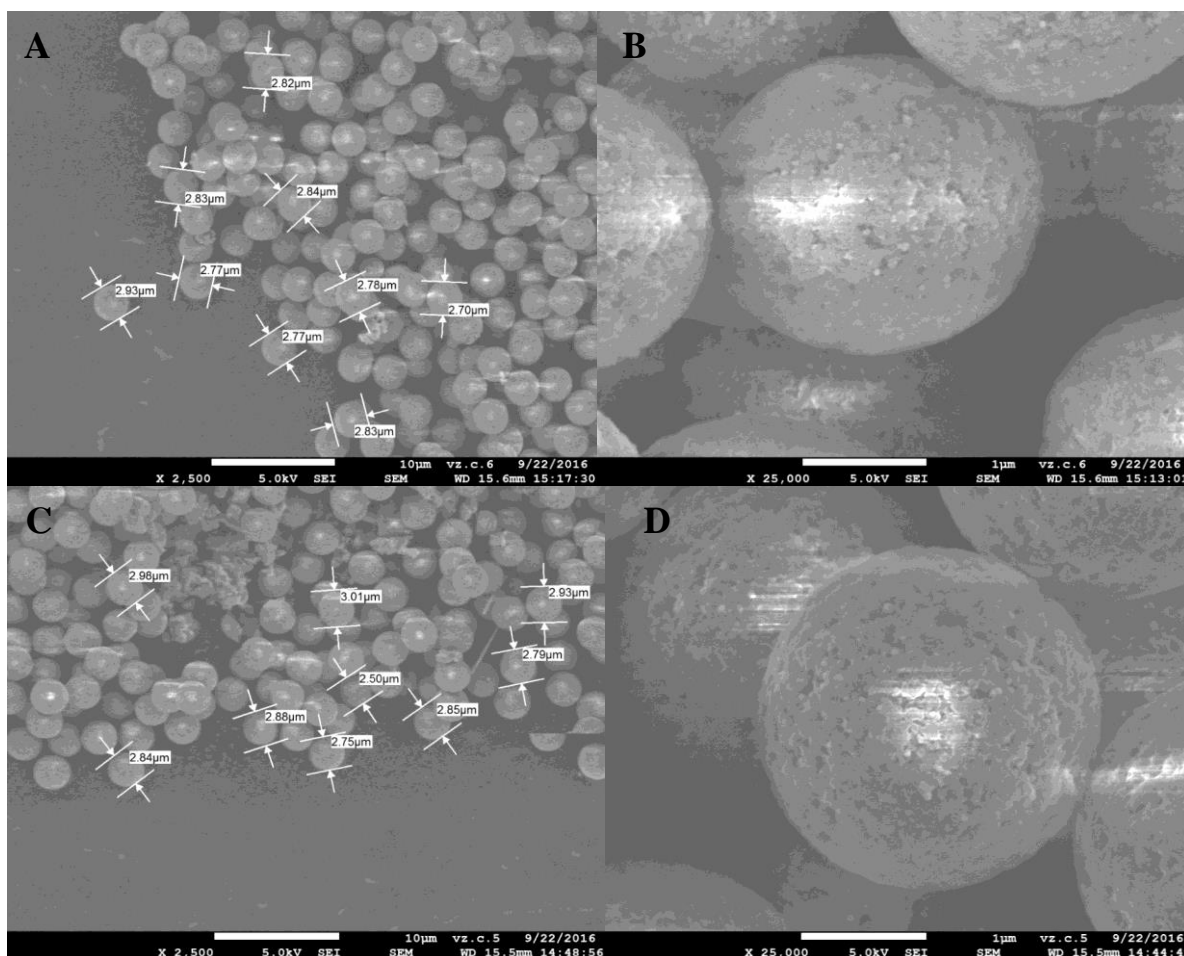


Obrázek 26 Čisté magnetické částice ProMAG-Carboxyl, sušené při 37 °C. A – zvětšeno 25 000x; B – zvětšeno 50 000x.



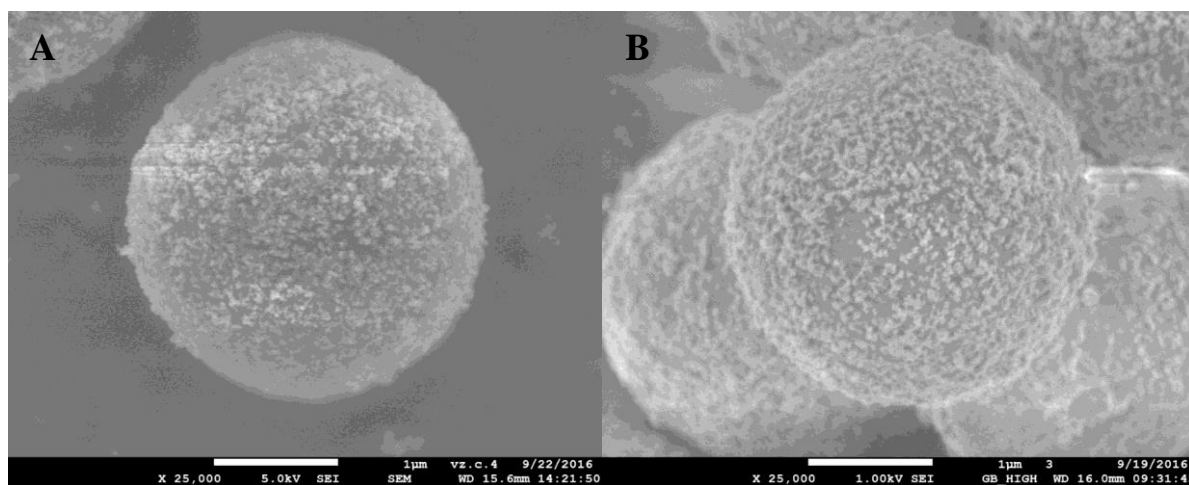
Obrázek 27 Magnetické částice ProMAG-Carboxyl s vázaným enzymem, sušené při 37 °C. A - zvětšeno 5 000x; B – zvětšeno 50 000x.

9.4. Příloha D - Dynabeads M-270 Amine (Invitrogen Dynal, Carlsbad, CA, USA, průměr: 2,8 μm)



Obrázek 28 Čisté magnetické částice Dynabeads M-270 Amine, sušené při 37 °C (obr. A, B). Magnetické částice Dynabeads M-270 Amine s vázaným enzymem, sušené při 37 °C (obr. C, D). A – zvětšeno 2 500x; B – zvětšeno 25 000x; C – 2 500x; D – 25 000x.

9.5. Příloha E - Micromer-M NH₂ (Micromod, Rostock, Německo, průměr: 3 μm)



Obrázek 29 A - Čisté magnetické částice Micromer-M NH₂, sušené při 37 °C. Zvětšené 25 000x. B - Magnetické částice Micromer-M NH₂ s vázaným enzymem, sušené při 37 °C. Zvětšené 25 000x.