

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

**Prionové choroby, diagnostika a souvislost
s neurodegenerativními chorobami**

Kristýna Antošová

Bakalářská práce
2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristýna Antošová**
Osobní číslo: **C16219**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Prionové choroby, diagnostika a souvislost s neurodegenerativními chorobami**
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 :

V dostupné literatuře se seznamte s prionovými chorobami, patologií prionů a také jejich současnou diagnostikou včetně experimentálních přístupů.
Zaměřte se na souvislosti s neurodegenerací na molekulární úrovni, případně dalších úrovních. Příkladem je vztah k beta amyloidu.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Kristýna Antošová

Poděkování

Ráda bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce paní Mgr. Marcelu Slovákové Ph.D., která mi poskytla cenné rady, měla vlídný přístup a mnoho trpělivosti pro mou práci.

Z celého srdce děkuji svým rodičům, kteří při mně stáli a dodávali mi odvahu jít dál. A v neposlední řadě svým blízkým a přátelům bez kterých bych neměla dost odhodlání a síly pro svou práci.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena na prionová onemocnění, jejich diagnostiku, molekulární mechanismy patologie, vlastnosti prionové molekuly v kontextu s ionty kovů a souvislost s neurodegenerativními onemocněními. Cílem práce bylo shrnutí poznatků o těchto chorobách, nových metodách diagnostiky a spojení diagnostiky a mechanismů patologie s dalšími neurodegenerativními onemocněními.

KLÍČOVÁ SLOVA

priony, PrP^C , PrP^{SC} , struktura a funkce prionů, prionová teorie, prionózy, transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE), Creutzfeldt-Jakobova choroba (CJD), bovinní spongiformní encefalopatie (BSE), scrapie

TITLE

Prion diseases, diagnosis and connection with neurodegenerative diseases

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on prion diseases, their diagnostics, molecular mechanisms of pathology, properties of prion molecules in the context of metal ions and their connection with neurodegenerative diseases. The aim of this work was to summarize the knowledge of these diseases, new methods of diagnosis and linking of diagnostics and pathology mechanisms with other neurodegenerative diseases.

KEYWORDS

prions, PrP^C , PrP^{SC} , structure and function of prions, prion theory, prion diseases, transmissible spongiform encephalopathy (TSE), Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), bovine spongiform encephalopathy (BSE), scrapie

Obsah

Seznam obrázků	6
Seznam zkratk a značek	7
Terminologie	8
Úvod	9
1. Prionová onemocnění	10
1.1. Animální onemocnění	10
1.1.1. Klusavka	10
1.1.2. Bovinní spongiformní encefalopatie	11
1.1.3. Chronické chřadnutí jelenovitých	12
1.1.4. Další onemocnění	12
1.2. Lidská onemocnění	13
1.2.1. Kuru	14
1.2.2. Creutzfeldt-Jacobova nemoc (CJD)	14
1.2.3. Fatální familiární insomnie (FFI)	15
1.2.4. Gerstmannova-Strausslerova-Scheinkerova nemoc (GSS)	16
2. Priony	17
2.1. Molekulová struktura nativní formy prionu PrP ^c	18
2.1.1. Biosyntéza PrP ^c v buňce a výskyt v organismu	18
2.1.2. Vlastní struktura a vlastnosti	19
2.1.3. Funkce	20
2.2. Molekulová struktura infekční formy prionu PrP ^{Sc}	21
2.2.1. Vlastní struktura a vlastnosti PrP ^{Sc}	21
2.2.2. Mechanismus vzniku PrP ^{Sc} z PrP ^c	22
2.3. Možnosti přenosu PrP ^{Sc} u lidských pacientů	23
2.4. Princip patologického působení PrP ^{Sc}	24
2.5. Prionová molekula a ionty kovů	25
3. Diagnostika pacienta	27
3.1. Klinický obraz pacienta	27
3.2. Doporučená vyšetření	28
3.2.1. Další vyšetření	28
3.3. Laboratorní vyšetření přítomnosti PrP ^{Sc}	31
3.3.1. RT-QuIC test pro vyšetření přítomnosti PrP ^{Sc}	32

3.3.2. Vyšetření post mortem při ověření diagnózy neurodegenerativního onemocnění	32
3.4. Možné terapeutické postupy	33
4 Prionové molekuly v souvislosti s jinými neurodegenerativními onemocněními.....	35
4.1. Podobnost CJD a Alzheimerovy choroby	35
4.1.1. Alzheimerova choroba.....	36
4.1.2. Mechanismus poškození mozku u neurodegenerativních chorob pomocí konformačně pozměněných bílkovin	36
4.1.3. Diagnostické markery společné pro neurodegenerativní onemocnění	37
Závěr	39

Seznam obrázků

Obrázek 1 <i>Výrazná vakuolizace mozkové tkáně u Creutzfeldt-Jakobovy choroby. Upraveno podle (49)</i>	18
Obrázek 2 <i>Struktura nativního prionu PrP^c. Upraveno podle (1)</i>	18
Obrázek 3 <i>EEG obraz Upraveno podle (11)</i>	30
Obrázek 4 <i>Vyšetření mozku magnetickou rezonancí. Upraveno podle (32)</i>	30
Obrázek 5 <i>Neuropatologické vyšetření mozkové tkáně prionového onemocnění. Upraveno podle (47)</i>	33

Seznam zkratek a značek

BSE	bovinní spongiformní encefalopatie
CJD	Creutzfeldt–Jakobova nemoc
CNS	centrální nervová soustava
CWD	chronické chřadnutí jelenovitých
Da	Dalton (jednotka atomové hmotnosti, přibližně se rovná hmotnosti atomu)
EEG	elektroencefalogram
ELISA	enzymoimunoanalýza
FFI	fatální familiární insomnie
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GSS	Gestermann–Sträussler–Scheinkerův syndrom
MR	magnetická rezonance
PrP	prionový protein
PrP ^c	nativní prionový protein (buněčný prionový protein)
PrP ^{Res}	zbylá část prionové molekuly po štěpení, sloužící k diagnostice
PrP ^{sc}	patologický prionový protein
PRPN	gen pro prionový protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
sCJD	sporadická Creutzfeldt–Jakobova nemoc
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
THS	tetrahydro-11-deoxykortikosteron
TSE	transmisivní spongiformní encefalopatie
USA	Spojené státy americké

Terminologie

Akinetický mutismus	vzniká při těžké destrukci obou frontálních laloků, pacient působí sice vigilním dojmem, má otevřené oči, ale je zcela nehybný, inkontinentní a neschopen komunikace s okolím
Amplifikace	zvýraznění, rozšíření, rozmnožení
Glióza	nahromadění gliie, zmnožení podpůrných buněk nervové tkáně, zbytnění gliové tkáně
Eradikované	vymýcené (onemocnění)
Iatrogenní	způsobený lékařem v negativním smyslu, např. chybným výkonem
Incidence	nemocnost, demografický ukazatel – poměr nově vzniklých případů onemocnění v daném časovém období k celkovému počtu osob ve sledované populaci
Infaustní	nepříznivý, beznadějný (o průběhu nemoci)
Lipidové rafty	mikrodomény buněčné membrány vyznačující se vysokým obsahem cholesterolu, sfingolipidů a glykolipidů
Myoklonus	křečovitě stažení svalu, nebo skupiny svalů
Nystagmus	záškuby, třes očí, svévolné, rychle se opakující rytmické pohyby, záškuby očí
Preklinický	před zjevným stádiem choroby
Pulvinární	zadní volně vyčnívající část thalamu
Rigidní	ztuhlý, neohebný
Spongiformní	houbovitého vzhledu nebo charakteru
Sporadický	ojedinělý, vzácný

Úvod

První sledované prionové choroby se vyskytly u ovčí, koz a následně skotu. Nejznámějšími jsou česky zvaná klusavka (anglicky scrapie) a nemoc šílených krav (BSE). Tato onemocnění mají dlouhou inkubační dobu, ale od prvních klinických příznaků je postup velmi progresivní a končí smrtí. Není známa žádná účinná a běžně používaná léčba. Největší epidemie nemoci šílených krav postihla především Velkou Británii v 80. až 90. letech 20. století. Epidemie se rozšířila ale i v jiných evropských zemích. Měla velké hospodářské a ekonomické dopady na evropské společenství.

K lidským prionovým chorobám řadíme především Creutzfeldt-Jakobovu nemoc (CJD), která se vyskytuje ve formách sporadické, familiární a variantní. Další onemocnění jsou Fatální familiární insomnie (FFI) či Gestermann–Sträussler–Scheinkerův syndrom (GSS). Prionové choroby nejsou nejpočetnější částí neurodegenerativních chorob rozšířených v současné populaci. Avšak jejich mechanismus působení a princip šíření je velmi podobný jiným závažným onemocněním jako například Alzheimerově chorobě, která je především u starších lidí velmi rozšířena.

Diagnostika je značně obtížná a používána především k rozlišení od jiných neurodegenerativních onemocnění. Další výzkum a zkoumání těchto onemocnění může do budoucna pomoci jejich časnější diagnostice a získání nových možných terapeutických postupů.

1. Prionová onemocnění

Prionová onemocnění jsou nevy léčitelná onemocnění člověka a dalších savců. Mezi ně řadíme ovce, kozy, skot, kočky, kočkovité šelmy, jelenovité a další. Onemocnění postihuje nervovou soustavu a mezi hlavní příznaky řadíme neurodegeneraci, která se hlavně projevuje špatnou motorikou, třesem a demencí. Další typickou vlastností onemocnění je rychlý progres nemoci až úmrtí nakaženého jedince. Doba od nakažení po projevení prvních příznaků může být i desítky let. Naopak od projevu prvních příznaků je doba života mezi několika měsíci až dvěma lety (2). V současnosti diagnostikujeme také prionové onemocnění geneticky podmíněné, jehož základem je mutace genu pro prionový protein (PRPN). Nejčastějším animálním onemocněním je klusavka u ovcí a koz a bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) skotu. Lidské onemocnění s největším výskytem je Creutzfeldt-Jakobova nemoc (CJD). Incidence lidských prionóz je 1-2 případy na milion obyvatel za rok, ale mnozí nakažení mohou uniknout diagnostice. V České republice bylo mezi lety 2013-2018 zaznamenáno 112 případů Creutzfeldt-Jakobovy nemoci (2,3,4).

1.1. Animální onemocnění

První objevené onemocnění způsobené infekční prionovou částicí (PrP^{sc}) bylo onemocnění koz a ovcí, tzv. klusavka. Mezi největší epidemie patřilo rozšíření bovinní spongiformní encefalopatie (zkráceně BSE). Tato epidemie zasáhla chovy především v Anglii, ale i dalších evropských zemích. Prion je velmi odolnou infekční částicí a nelze ji obvyklými způsoby pro zničení infekčních DNA patogenů zničit či poškodit. Zvířata se mohou nakazit mezi sebou prostřednictvím slin, krve, trusu a moči. Dalším zdrojem nákazy je i prostředí, kde již nakažená zvířata přežívala, např. půda. Velkým zdrojem nákazy v minulosti byla masokostní moučka vyráběná z uhynulých zvířat nakažených infekčními priony. Tento produkt sloužil k výživě hospodářsky chovaných zvířat, a to především kvůli vysokému obsahu bílkovin a tuků. Díky rozvoji výrobních metod a přísným kontrolním normám se již nákaza tímto způsobem nešíří (3).

1.1.1. Klusavka

Klusavka je onemocnění nervové soustavy ovcí a koz. V literatuře ji najdeme také pod pojmem Scrapie z anglického označení. Toto onemocnění bylo popsáno již v 18. století

v Anglii a následně bylo rozšířeno do celé Evropy a Severní Ameriky (5). Jedná se o první popsané onemocnění způsobené infekčními priony. Mezi hlavní příznaky patří nepříjemné svědění vedoucí k výraznému drbání a následně ke ztrátě srsti, špatná motorika jedince a třes. Dalšími symptomy jsou změny chování, a to například zvýšená nervozita, agresivita a asociální chování. Zvířata jsou přecitlivělá na své okolí především na zvuk a pohyb. V současnosti se s tímto onemocněním setkáváme celosvětově. Onemocnění je přenosné různými způsoby, např. z matky na potomka nebo ze zvířete na zvíře. Během výzkumu tohoto onemocnění bylo zjištěno, že rezistence či naopak zvýšená náchylnost některých jedinců, je ovlivňována genem PRNP. Na tomto základu se dá předpokládat, že cíleným šlechtěním ovcí lze zvýšit odolnost jejich organismu vůči prionovému onemocnění (3).

1.1.2. Bovinní spongiformní encefalopatie

Bovinní spongiformní encefalopatie (BSE), rozšířená pod názvem „nemoc šílených krav“, je prionové onemocnění postihující skot. První diagnostika proběhla v 80. letech 20. století. Následně se z BSE stala epidemie a postihla mnoho evropských zemí. Největší výskyt byl ve Velké Británii, Irsku, Švýcarsku a dalších. Zdrojem infekčních PrP^{Sc} bylo doplňkové krmivo zvířat. Masokostní moučka byla vyráběna především z vnitřností a celých těl ovcí, skotu, prasat a kuřat, která je používána pro svůj vysoký obsah proteinů. Epidemie se rozšířila při změně výrobního procesu. Díky novému výrobnímu postupu takto vyrobená masokostní moučka obsahovala vyšší obsah tuku a tím se zvýšila kvalita vyživovacích vlastností. Tato změna však způsobila přenos infekčních částic z nemocných zvířat. Hlavním zdrojem byly ovce trpící klusavkou, ale i skot u něhož se vyskytovala sporadická forma tohoto onemocnění. Toto onemocnění mělo velký vliv na hospodářskou ekonomiku celé Evropy. Zlomovým rokem byl rok 1988, kdy byl vydán zákon o krmivech, jenž výrazně snížil výskyt BSE (6).

Interval od nakažení jedince pro projev prvních příznaků se pohybuje mezi 4-5 lety. Klinické příznaky trvají 1-8 měsíců do úhynu jedince. Mezi hlavní projevy onemocnění patří změny v chování napadeného jedince. Stejně jako například u klusavky je zde přecitlivělost na zvuk, světlo, asociální chování, bojácnost či neklid. Tyto symptomy následují problémy s koordinací a to například nekoordinovaná chůze. Typické jsou rozcházející se končetiny a zvedání končetin do velké výšky. Laktace je výrazněji nižší a zvířata ubírají na váze.

V konečném stádiu zvířata nevstávají ze země, trpí třesem svalů a postupně selhává celý organismus (4,6). (5) (7)

1.1.3. Chronické chřadnutí jelenovitých

Chronické chřadnutí jelenovitých (zkráceně CWD) bylo zařazeno v 19. století k spongiformním encefalopatiím napadající tři druhy jelenů a losů. Hlavním centrem výskytu byla Severní Amerika, od roku 2016 jsou případy i v oblasti severní Evropy. První evropský případ byl sledován v Norsku v roce 2016 a v současné době probíhá podrobný monitoring nařízený Evropským úřadem pro kontrolu potravin, do kterého se zapojilo 6 severoevropských států včetně Norska, které není členským státem Evropské unie. Již dříve, a to v letech 2007 až 2009, proběhlo celoevropské vyšetření divoké zvěře, kdy bylo testováno přes 13 tisíc jedinců. U žádného z nich nebyl prokázán pozitivní výsledek na CWD. V České republice nebyl zachycen žádný případ nakaženého zvířete (7). Onemocnění se vyskytuje především u divoce žijících zvířat, ale také u zvířat chovaných na farmách. Inkubační doba se pohybuje u vysoké zvěře mezi 12 a 34 měsíci. Nakažená zvířata trpí na změny chování např. lhostejnost, špatná nálada, svěšená hlava či sklopené uši. Zvířata sužuje nechutenství, výrazně hubnou často trpí žízní a sliněním. Napadená zvířata umírají na orgánová selhání, častým důvodem je i zápal plic. Na základě těchto a dalších komplikací jsou zvířata utracena.

Pravděpodobným zdrojem nákazy jsou moč, výkaly a sliny. Zvířata proto šíří nákazu mezi sebou z nemocného jedince na zdravého nebo se nakazí z prostředí např. z půdy, trávy či vody. Prozatím nebyl potvrzen žádný případ přenosu infekčního prionu způsobující CWD na člověka, kde by následně byl původem lidské prionózy (3).

1.1.4. Další onemocnění

Prionová onemocnění nepostihují jen ovce, kozy, skot a jelenovitou zvěř. K dalším skupinám nakažených druhů řadíme např. norky. Toto onemocnění je nazýváno transmisivní encefalopatie norků. Popsáno bylo již v 50. letech 20. století u norků chovaných na farmách v Kanadě, USA, Finsku, Německu nebo v oblastech dnešního Ruska. Na farmách jsou zvířata chována ve velkém počtu na menším prostoru, než žijí ve volné přírodě, často krmena ostatky z jatek. Norci následně mohou nakazit další skupiny zvířat jako kozy, ovce, skot, makaky či skunky, lasice, kuny a další. Šíření je mezi norky zprostředkováno přímým kontaktem nakažených zvířat se zdravými jedinci nebo orální cestou. Přenos je možný i kanibalismem mezi jedinci. Inkubace trvá od 6 do 12 měsíců a smrt nastává do 8 týdnů od prvních příznaků,

kterými jsou změny chování, křeče, třes, slinění, časté hryzáni okolních předmětů i sebe samých a zkroucení ocasu (8).

Felinní spongiformní encefalopatie je onemocnění vyskytující se u koček a kočkovitých šelem chovaných v zajetí ve většině případech původem z Velké Británie. První příznaky se u jedinců projeví nejdříve ve dvou letech života ale i ve vyšším věku. Zvíře umírá 3-10 týdnů od prvních příznaků. Klinickými symptomy jsou změny chování, deprese, nechutenství, nadměrné slinění, třes až křečovitě stavy, ztráta zájmu péče o srst, špatný odhad vzdáleností. Za původce onemocnění je označována epidemie BSE ve Velké Británii v 80. a 90. letech minulého století.

Encefalopatie exotických kopytníků chovaných v zoologických zahradách byla způsobena krměním masokostní moučkou v 80. letech ve Velké Británii. Toto krmivo bylo vyrobeno ze zvířat nakažených BSE. Nakažení byli např. kudu, antilopy, přimorožci a další druhy. Konkrétní příznaky se lišily druh od druhu, ale několik symptomů zůstávalo pro všechny stejné a to slinění, změny chování jedince a třes. Všechna nakažená zvířata onemocnění podlehla. Obdobně v 90. letech bylo také popsáno nakažení lemuru a makaků v zoologických zahradách ve Francii. Zvířata měla být nakažena krmivem vyrobeným ve Velké Británii, kde tou dobou byla rozšířena masivně epidemie BSE. Rozvinuté prionové onemocnění bylo také popsáno u pštrosů (3).

Onemocněním trpí i myši a křečci. Toho faktu se využívá při dalším výzkumu těchto onemocnění. Zvířata slouží jako modelové organismy nebo jako indikátorovi jedinci při potvrzení diagnóz (8).

1.2. Lidská onemocnění

Lidská prionová onemocnění jsou nevléčitelná neurodegenerativní onemocnění s velmi dlouhou inkubační dobou a velmi rychlým progresivním šířením od prvních příznaků (1). Tato onemocnění je možno dělit do tří skupin dle původu vzniku. První skupina vzniká následkem infekce z vnějšího prostředí např. požitím (maso z krav s BSE, nakažená mozková tkáň pozřená při kanibalismu), přenosem z infikovaného prostředí (v půdě přežívají priony i desítky let, dostaly se do ní například močí a trusem nakažených zvířat), iatrogenním přenosem z infikovaných chirurgických nástrojů, při transplantacích nebo transfúziích. Druhá skupina je geneticky podmíněná a vzniká vrozenou mutací genu PRPN. Poslední skupina je tvořena náhodnými sporadickými onemocnění, kde původ vzniku onemocnění není jasný a

lze vyloučit tradiční příčiny jako je geneticky podmíněná tvorba PrP^{sc} nebo nákaza infikovanou částicí všemi způsoby (2).

1.2.1. Kuru

Toto lidské onemocnění je již v současnosti eradikované. Vyskytovalo se mezi příslušníky kmene Fore z Papue-Nové Guinei. Kmene bojových kanibalů, kteří vyznávali rituální kanibalismus. Jednalo se o onemocnění mužů, žen a dětí. Mezi významné klinické projevy patřila rozšiřující mozečková ataxie projevující se třesem („kuru“ v jazyku kmene znamená třes), později demence, obtížné polykání, inkontinence stolice a moči. (9) Pacient umíral od prvních příznaků během 3-9 měsíců. K vymýcení této choroby došlo eliminováním rituálního kanibalismu (10).

1.2.2. Creutzfeldt-Jacobova nemoc (CJD)

Creutzfeldt-Jacobova nemoc je nejčastějším onemocněním způsobeným infekčními priony u lidí. Jsou rozlišovány 4 hlavní varianty této choroby. Prvním typem je sporadická CJD. Zpočátku onemocnění trpí pacient nespecifickými příznaky jako například únava, nespavost, nechutenství, poruchy nálady nebo paranoidní myšlenky. V pokročilém stádiu onemocnění dojde k rychlému progresu zhoršování kognitivních funkcí. Dalšími příznaky jsou neurologické příznaky jako myoklonus, pyramidové jevy, tiky, dystonie, třes a další. V terminálním stádiu pacient trpí imobilitou, inkontinencí, pseudobulbární syndromem, akinetickým mutizmem a korovou slepotou (2).

Druhým typem CJD je geneticky podmíněná forma s autozomálně dominantní dědičností. Dochází k mutacím na genu PRNP a příznaky jsou stejně jako u sporadické formy (11).

Třetím typem je iatrogenní CJD, tato forma je způsobena vnější nákazou infekční molekulou PrP^{sc}. K přenosu docházelo při léčbě růstovým hormonem připravených z hypofýz již zemřelých dárců. V současné době jsou tyto hormony připravovány synteticky. Dále docházelo k přenosu při transplantaci tvrdé pleny, perikardu jako náhrady ušního bubínku nebo oční rohovky. Tyto transplantáty musí projít testováním na přítomnost PrP^{sc} před samostatnou transplantací, aby se zamezilo přenosu infekčních částic. Další cesty přenosu mohou být z chirurgických nástrojů, a to díky vysoké odolnosti prionových molekul především vůči teplotám, které jsou přítomny na nástrojích i po sterilizaci (12).

Poslední formou CJD je tzv. nová varianta CJD, která je stejné příčiny jako bovinní spongiformní encefalopatie (BSE). Původcem onemocnění je hovězí maso nakažené BSE. Odlišností je průměrný věk pacienta v době smrti. Pohybuje se okolo 29 let. Nejčastěji je inkubační doba 10 let a více. Průběh samotného onemocnění je pomalejší než u ostatních forem CJD. Vyšetřením tkání tonzil, slepého střeva nebo sleziny lze prokázat přítomnost infekčních forem PrP^{sc} ještě před rozvojem onemocnění. Odlišné jsou i klinické projevy. Například výrazná emoční labilita, sklony k depresím, paranoia, zrakové poruchy, parestezie, dysestezie, to vše vedoucí k těžké demenci a mutizmu. Z vyšetřovacích metod nejsou patrné typické změny na EEG a není pozitivní přítomnost proteinu 14-3-3 v likvoru. Protein 14-3-3 tvoří skupina sedmi izotopových signálních molekul, které se nacházejí v centrální nervové soustavě a podílejí se na fyziologických funkcích CNS. Konkrétní funkce těchto proteinů není zcela známa. Nejdůležitější stanovovanou částí je β -podjednotka. Jedná se tedy o nespécifický marker neurálního rozpadu. Zvýšené koncentrace této podjednotky 14-3-3 proteinu lze stanovit u neurodegenerativních chorob jako například roztroušená skleróza, Hashimotovy encefalitidy a další. Výsledky stanovení jsou velmi závislé na odběru vzorku a konkrétní metodě a postupu. U ostatních variant CJD se stanovení tohoto markeru užívá k potvrzení diagnózy (13). Na magnetické rezonanci je diagnostikován pulvinární příznak, což jsou hyperintenzity v oblasti pulvinaru v T2 a FLAIR. K přenosu onemocnění z člověka na člověka může dojít krevní transfúzí.

Prognóza všech těchto onemocnění je nepříznivá. Cílí se na symptomatickou léčbu a kvalitní paliativní péči v terminálních stádiích (2).

1.2.3. Fatální familiární insomnie (FFI)

Jedná se o onemocnění s malou četností. Se stejným průběhem se vyskytuje také Sporadická fatální insomnie (FSI), která není vázána na dědičnost mutace PRNP genu jako FFI. (10) Mezi klinické projevy lze řadit rezistentní nespavost i neurologické příznaky jako například myoklonus, ataxie či rigidita (9). V posledních stádiích se projevuje celkovou insomnií, těžkou demencí a mutizmem. Od prvních příznaků se onemocnění vyvíjí 6-36 měsíců a končí smrtelně.

1.2.4. Gerstmannova-Strausslerova-Scheinkerova nemoc (GSS)

Gerstmannova-Strausslerova-Scheinkerova nemoc (GSS) je vzácné dědičné genetické onemocnění. Jedná se o autozomálně dominantní dědičnost. Od Creutzfeldt-Jakobovy nemoci se odlišuje především delším průběhem a to až 5 let. Nejčastěji se projevuje se pacientů mezi 30. a 40. rokem života. V klinickém obrazu pacienta jsou nejvíce zastoupené mozečkové a pyramidové patologické změny, až později se projevují neurologické příznaky. Je způsobena mnohočetnými mutacemi PRNP genu na 20. chromozomu. Prognóza pacienta s GSS je nepříznivá a léčba není známa (10).

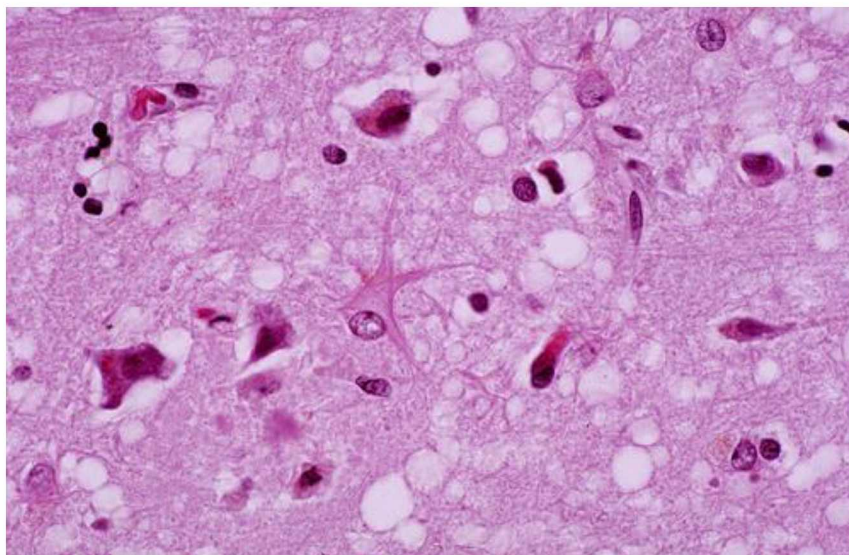
2. Priony

Priony jsou molekuly bílkovinného charakteru, které jsou děleny do dvou skupin, a to organismu přirozené, lze nazývat přirozené (PrP^c) a infekční priony (PrP^{sc}) vzniklé konformační změnou struktury nativních prionů, které dále dělíme do různých kmenů. Infekční prionové částice způsobují závažná neurodegenerativní onemocnění lidí i zvířat (14). Označení *prion* vzniklo zkrácením anglického termínu „proteinaceous infectious particle“ znamenající proteinová infekční částice.

Priony jsou nejmenší známé struktury schopny vyvolat patologické změny a zároveň nejsou běžně imunogenními částicemi. Imunitní systém organismu na ně proto nereaguje vytvořením příslušného titru protilátek, který by byl schopný vyvolat imunitní reakci (15). Ve starší literatuře je najdeme také pod názvem pomalé nebo nekonvenční viry (16). Toto označení lze interpretovat tak, že jejich působení se blízce podobá šíření virového onemocnění. K rozšíření prionů a vzniku onemocnění je zapotřebí buněk, které obsahují nativní formy prionu, ty po styku s infekční formou dají vzniku dalších infekčních částic. Tyto infekční částice však neobsahují žádnou genetickou informaci, která by podněcovala jejich „rozmnožování“, tak jak je to u virů a virové replikace v hostitelské buňce (17).

Onemocnění způsobené infekční konformací prionu PrP^{sc} jsou řazena mezi encefalopatie, konkrétně spongiformní (18). Označení spongiformní popisuje histologický obraz mozkové tkáně, která je výrazně vakuolizována a připomíná tak mořskou houbu (viz obr.č.1) (19).

Typickými vlastnostmi prionových onemocnění je dlouhá inkubační doba až desítky let, velmi rychlé a progresivní terminální stádium onemocnění s neurologickými příznaky jako jsou demence, postižení zrakově-prostorových funkcí a také poškození kognice různého charakteru (11). Tato onemocnění mají fatální následky. Řadíme je mezi infaustní choroby.



Obrázek 1 Výrazná vakuolizace mozkové tkáně u Creutzfeldt-Jakobovy choroby.
Upraveno podle (19)

2.1. Molekulová struktura nativní formy prionu PrP^c

Prion v lidském organismu je zakódován konzervativním genem PRNP, který je uložen na krátkém raménku 20. chromozomu (14) a u skotu a ovcí na chromozomu číslo 13. Prionový protein tělu přirozený je glykoprotein umístěn na povrchu prakticky všech buněk organismu savců s dominantním výskytem v tkáni centrální nervové soustavy (20). Poločas života molekuly je 3 až 6 hodin. Ve své sekundární struktuře obsahuje tento protein vysoký podíl α -helix uspořádání, které je hlavním rozdílem mezi formou PrP^c a PrP^{sc}. Díky tomuto složení má nativní forma prionu chemické i biologické vlastnosti odlišné od infekční formy prionové bílkoviny.

2.1.1. Biosyntéza PrP^c v buňce a výskyt v organismu

PrP^c je buněčný protein vázaný na povrchu buněk. Především v místech vysoké koncentrace signálních molekul, tzv. lipidových raftů nebo mikrodomén (22). Mikrodomény jsou malé útvary složené z kombinace glykosfingolipidů a proteinových receptorů, které jsou umístěny v plasmatické membráně. Jejich složení se výrazně liší od plasmatické membrány, a to hlavně poměrem sfingomielinu, který má vyšší zastoupení než fosfatidylcholin. Fosfatidylcholin je naopak více obsažen v plasmatické membráně. Dále také obsahují až 5ti násobné množství cholesterolu, který se primárně podílí na soudržnosti a odolnosti lipidových

raftů. Funkcí lipidových raftů je tvorba organizačních center pro signální molekuly, zprostředkování transportu membránových proteinů a tím transmembránovou signalizaci a regulace synaptického přenosu (23,24).

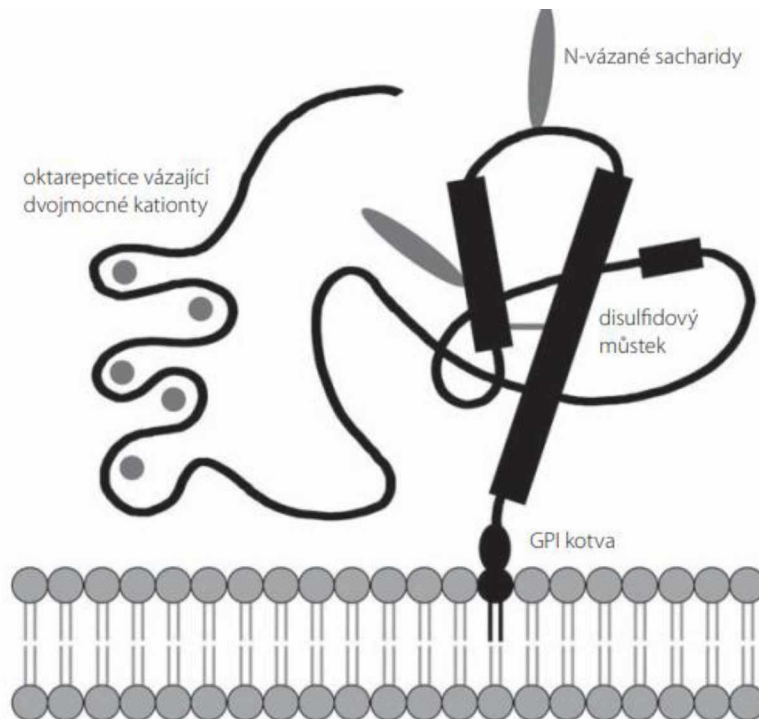
Buňky s povrchovým zastoupením prionů jsou především neurony a gliové buňky. Nachází se také v leukocytech nebo tkáních periferních nervů, lymforetikulárního systému, gastrointerstinálního traktu, varlat, ledvin a svalů (1,25).

2.1.2. Vlastní struktura a vlastnosti

Prionová molekula je syntetizovaná v endoplazmatickém retikulu, zde dochází k posttranslačním úpravám, odkud je transportována do Golgiho aparátu a následně přesunuta do plazmatické membrány. Zde je zabudován do lipidových raftů v cytoplazmatické membráně pomocí vazby GPI-kotvy (17).

Prionový prekurzorový protein je tvořen z 253 aminokyselinových fragmentů (14). Při posttranslačních úpravách prekurzorového proteinu je odštěpeno 22 aminokyselin z N-konce proteinu a na C-terminální doménu je připojena v endoplazmatickém retikulu glykosylfosfatidylinositolová kotva (GPI), která zprostředkovává vazbu do cytoplazmatické membrány. Následně je zde také odštěpeno 23 aminokyselin z C-konce. Výsledný upravený prionový protein v primární struktuře má 208 aminokyselin.

Sekundární struktura prionového proteinu je tvořena již jasně rozlišitelnými doménami, které jsou zobrazeny na obrázku číslo 2 (1). Prionový protein je tvořen N-terminální signální doménou, které součástí je řada pěti oktapeptidových repetic bohatých na histidin a glycin. Tato oktapeptidová repetic slouží jako vazebné místo pro dvojmocné ionty kovů např. mědi, niklu, manganu nebo zinku (21). Dále je prionový protein složen z centrálního hydrofobního segmentu a C-terminální oblasti, která je rozdělena do tří α -šroubovic a jednoho antiparalelního β -skládaného listu. Mezi cysteiny v řetězci je disulfidický můstek. C-terminální doména obsahuje také dvě N-glykosylační místa a díky tomu se může vyskytovat přirozený prionový protein v různých formách a to neglykosylovaný, monoglykosylovaný nebo diglykosylovaný (1). Finální forma lidského přirozeného prionového proteinu je dlouhá 209 aminokyselin a má molekulovou hmotnosti 35-36 kDa (14).



Obrázek 3 Struktura nativního prionu PrP^c. Upraveno podle (1)

2.1.3. Funkce

Konkrétní fyziologická funkce prionové bílkoviny není doposud zcela známa (1). Jednou z možných funkcí PrP^c je zabránění apoptóze buněk. Tato schopnost je umožněna buněčnou superoxidodismutázou (SOD), která je aktivována oktapeptidovou repeticí na N-terminální části a hydrofobní oblastí prionu. K aktivaci SOD je nutné navázání stresového proteinu např. heat shock protein nebo stress-inducible protein 1. Prion je jednou z částí obranného systému buňky před oxidačním stresem (25,26). Ionty kovů, nacházející se ve tkáních, jsou jednou z příčin tvorby volných radikálů a tím vzniku oxidačního stresu. Molekula PrP^c má schopnost navázat do své struktury oktapeptidových repetitiv dvojmocné ionty kovů například mědi a pomocí tzv. klatrinové jamky je celá tato struktura pohlcena dovnitř buňky a iont kovu převeden do endozomu a cytosolu buňky. Struktura PrP^c je následně opět navázána na povrch buňky, aby v případě přítomnosti dalších iontů mohla vyvázat další ionty (27). K obrannému systému buňky před oxidačním stresem řadíme především antioxidanty například vitamíny, karotenoidy nebo flavonoidy. Buňky bez PrP^c navázaným na jejich povrchu jsou dle výzkumu s tkáňovými kulturami mozečku mnohem náchylnější oxidačnímu poškození a lehce podléhají apoptóze (28). Zastoupení PrP^c má vliv na afinitu proteinu Bax, který je iniciátorem řízené buněčné smrti. PrP^c nemá intracelulární doménu a není schopen iniciovat signální kaskádu uvnitř buňky, ale má vysokou afinitu

k množství buněčných proteinů, které mohou působit jako přenašeče signálu od prionu do vnitřního prostředí buňky. Konkrétní mechanismus působení, ale není znám. Prionový protein je schopen sloužit jako specifický receptor oligomerů β -amyloidu, ale není schopen vázat monomery a fibrily téhož proteinu (1).

Při zkoumání dalších vlastností a vlivů PrP^c byl analyzován vliv přítomnosti PrP^c na kvalitu a odolnost myelinových pochev axonů. Výzkum byl prováděn na myších. Jedna skupina myši nepodléhala žádné úpravě a druhé skupině byl odstraněn nativní prion z organismu. U myši s potlačenou expresí PrP^c docházelo už v brzkém věku k demyelinizaci axonů a vyšší citlivosti na bolest vůči normálním myším. Ani při podávání PrP^c přímo do Schwanových buněk skupiny myši s potlačenou tvorbou prionů, které ovlivňují tvorbu myelinové pochvy, nedošlo ke zlepšení. Tento výzkum nepřímo potvrzuje podíl PrP^c na udržení kvality myelinových pochev neuronů v mozku. Tyto myelinové útvary postupem života jedince podléhají demyelinizaci a té pravděpodobně zabraňují enzymy štěpící prionové proteiny na menší segmenty, které následně vstupují do Schwanových buněk a podporují tak myelinizaci axonů periferních nervů (29).

2.2. Molekulová struktura infekční formy prionu PrP^{sc}

Infekční formu prionového proteinu je označováno zkratkou PrP^{sc}, kde „sc“ je zkratkou scrapie, prvního prokázaného onemocnění způsobeného priony. Tato molekula vzniká konformační změnou přirozené formy prionu. Jeho hromadění a rozpadání v nervové tkáni infikovaného jedince způsobuje odumírání a degradaci neuronů. Přesný mechanismus vzniku a další šíření v těle není zcela známo. Je popisováno několika teoretickými modely. Zdravý organismus může být nakažen priony několika cestami např. iatrogení, potravou či z jedince na jedince. Existují však i formy, které vznikají sporadicky bez známého důvodu nebo jsou geneticky podmíněné (17).

2.2.1. Vlastní struktura a vlastnosti PrP^{Sc}

Vlastnosti konformace infekčního prionu a nízká koncentrace nativního prionu v mozkové tkáni nakažených pacientů vede k rozvoji a šíření invazivních neurodegenerativních onemocnění (30). PrP^{sc} je výsledkem konformační změny nativní formy prionu. Odlišnost těchto molekul je v sekundární struktuře bílkoviny.

V sekundární struktuře se jedná o změnu v poměru procent struktury β -skládaného listu a α -helix. Tvoří se tzv. „cross beta helikální“ struktura, která je odolná proti proteolytickému štěpení a tvoří amyloidová fibrila (31). Kromě odlišností v struktuře prionové molekuly se také liší infekční částice svými dalšími vlastnostmi. S porovnáním s nativní molekulou má mnohem vyšší rezistenci k proteináze K, fosfolipáze C a k vysokým teplotám. Molekula je stálá, nerozpustná v detergentech a snadno agreguje a polymerizuje (14). PrP^{Sc} je odolný vůči standardním způsobům sterilizace např. autokláv vytemperovaný na 121 °C nebo UV a ionizující záření. Na infekční částici se netvoří specifické protilátky v takové koncentraci, která by vyvolala odpovídající imunitní reakci (15). Proto je i stanovení přítomnosti této molekuly a další její podrobnější výzkum velmi obtížný. Pravděpodobný výskyt PrP^{Sc} je umístění na plazmatické membráně či v endolyzozomálních strukturách, cytosolu nebo exozomech napadané buňky. Je popsáno několik různých prionových kmenů PrP^{Sc}, které se liší konkrétní konformací původní PrP a mírou glykosylace, která je součástí posttranslačních úprav. Jednotlivé kmeny se také liší charakterem onemocnění, jejich inkubačními dobou, progresí a klinickými příznaky v různé míře. Prionový kmen 1-3 je detekován u případů sporadické a získané CJD, kmen 4 u variantní CJD (32).

2.2.2. Mechanismus vzniku PrP^{Sc} z PrP^C

Konkrétní uložení procesu konformačních změn PrP^C na PrP^{Sc} není zcela známo. U geneticky podmíněných forem prionových onemocnění se PrP^{Sc} vytváří s největší pravděpodobností v endoplazmatické retikulu na základě mutace v aminokyselinové sekvenci proteinu. Při infikování organismu z vnějšího prostředí je podmiňující setkání exogenní infekční částice s endogenní nativní částicí prionu (33).

Důležitým bodem samotné konformační změny prionu je i jeho umístění v buňkách. Podle autorů existuje několik pravděpodobných teorií zohledňujících umístění v lipidových raftech. Prionový protein jako součást lipidových raftů je podmíněn jejich správným složením, stabilitou struktur a tato stabilita napomáhá rezistenci vůči konformačním změnám, který by nerovnováhou mohly být způsobeny. Pokud tedy molekula nativního prionu opustí lipidový raft při endocytóze a vystaví se tak negativně nabitě membráně, je zde lehčí cesta ke vzniku patologických forem PrP^{Sc}. Opačným názorem v literatuře je funkce lipidových raftů jako sběrných míst pro PrP^C, kde pak dojde k hromadnému infikování molekulami PrP^{Sc}. Další možností je rozložení jednotlivých izomerů do několika raftů a v případě jejich spojení dojde

tak k spuštění konformačních přeměn PrP^c (18,34). Faktorem, který má schopnost ovlivňovat konformační změnu, může být také přítomnost proteinu X nebo lipidového chaperonu, kteří usnadňují přeměnu nativních molekul na ty s infekčním potenciálem. Jedna z posledních možných teorií je funkce lipidových raftů jako transportních kanálů pro cestu prionů do intracelulárního prostoru, kde mohou probíhat konformační změny (24). Ke konkrétnímu mechanismu vzniku PrP^{sc} z PrP^c jsou navrženy i teoretické modely.

Prvním z nich je model matricový, pro který je hlavním principem působení exogenního PrP^{sc} a endogenního PrP^c. Tato interakce má za následek tvorbu konformačně pozměněných PrP^{sc}. Vysoká energetická bariéra zabraňuje spontánní konverzi. PrP^{sc} v tomto mechanismu funguje jako matrice či spouštěč, který svou strukturou tvoří prvotní model, podle kterého se pak tvoří již nově vznikající molekuly PrP^{sc} (35).

Podobný mechanismus vysvětluje i model teoretických chaperonů. Chaperon rozlišuje špatně sbalené nebo abnormální proteiny a zprostředkovává jejich transport do cytosolu, kde jsou ubikvitinovány a degradovány v proteazómu. V případě špatného odbourávání dochází k hromadění konformačně změněných prionů, stresu endoplazmatického retikula a spuštění odpovědi buněčné dráhy na tyto proteiny. Abnormální proteiny jsou následně transportovány na povrch buňky, kde vznikají plaky tvořeny těmito pozměněnými proteiny (31).

Principem nukleárně polymerizačního modelu je vratná termodynamická rovnováha mezi PrP^c a PrP^{sc}. Ke konverzi dochází díky rozložení struktury PrP^c. Po nashromáždění monomerů PrP^{sc} se tvoří tzv. agregát, který může k sobě přidávat další monomery PrP^{sc}. Infekční priony uvnitř jádra jsou stabilnější a postupně utvářejí amyloid. Štěpením s tvorbou fragmentů se pak tvoří větší počet patologických jader, z kterých se vázáním monomerů stávají jednotky PrP^{sc} (14).

2.3. Možnosti přenosu PrP^{sc} u lidských pacientů

Infekční prionové částice se do organismu mohou dostat mnohými způsoby. Tyto cesty můžeme rozdělit do několika kategorií. Prvním způsobem je přenos potravou tzv. alimentární cestou. Jedinec zkonsumuje maso ze zvířat trpících prionózou. Dříve docházelo k přenosu tím, že hospodářská zvířata byla krmena masokostní moučkou ze zvířat nemocných. Díky fyzikálním vlastnostem PrP^{sc} nebyla při zpracování molekula odstraněna nebo zničena. Takto nakažená zvířata byla následně poražena a jejich maso distribuováno k lidské potřebě. Nejvíce nakažených případů tímto způsobem bylo v 80. a 90. letech ve Velké

Británii. S velmi dlouhou inkubační dobou až desítky let jsou proto například dárci krve dotazováni, jestli nemohli být vystaveni možné nákaze. Cílem je zabránit přenosu prionů pomocí transfúze. Dalším velmi závažným rizikem přenosu je iatrogenní přenos. Tuto cestu infekční molekuly zprostředkovává lékař či nemocniční personál. Jedná se o přenos například při transplantacích oční rohovky, tvrdé pleny mozkové nebo infikovanými neurochirurgickými nástroji při operacích mozku. Transfer infekčních částic může být také skrz poraněnou kůži nebo orálně (20,36).

2.4. Princip patologického působení PrP^{sc}

Po první vstupu infekčních molekul PrP^{sc} do organismu nejčastěji poraněnou kůží nebo orální cestou, se začínají PrP^{sc} hromadit v lymfoidní tkáni ve folikulárních dendritických buňkách. Následně se infekční priony šíří do ostatních lymfoidních tkání pomocí lymfy a krve. Po jejich nahromadění v těchto tkáních se pravděpodobně přes sympatické nervy a vlákna *nervus vagus* dostávají do centrální nervové soustavy. Při hromadění infekčních molekul v buňkách nervové tkáně, nejsou tyto buňky schopny toto množství odbourávat. Při překročení kapacity daného neuronu je tento neuron pod zátěží infekčních molekul neschopen vykonávat svou funkci a dochází k jeho odumření. Takto vzniká řetězová reakce, která způsobuje degradaci celé nervové tkáně (2).

Principem degradace je tvorba amyloidních plaků na nervových vláknech. Amyloid je výsledek vysrážení fragmentů rozpadu proteinů bohatých na β -skládané listy. Hlavní charakteristikou je jeho nerozpustnost a tvorba nevětvených fibril. V místech tvorby plaku se rozvíjí zánět a jsou produkovány cytokiny, které nejen že usmrtí napadenou buňku, ale šíří se po okolí a poškozují okolní buňky. Přítomnost infekčních prionů v centrálním nervovém systému způsobuje zvýšení koncentrace časných a pozdních složek komplementu. Jeho přítomnost však není součástí ochrany nebo procesu poškození nervových buněk. Možným důvodem tak může být ochrana před možnou časnou lýzí zprostředkovanou komplementem (37).

V nervové tkáni vznikají neuropatologické změny jako například zmnožení mikroglie, vakuolizace neuronů a hromadění PrP^{sc}. Odumírání neuronů může být také způsobeno vyšším oxidativním stresem, který je následkem nesprávného fungování prionu, který buňku předním chrání. Dalším důvodem odumírání je porušení plazmatické membrány buněk díky

nahromadění PrP^{sc} nebo pomocí mikroglíí, které za přítomnosti PrP^{sc} jsou aktivovány a uvolňují kyslíkové radikály (36).

2.5. Prionová molekula a ionty kovů

Nervová tkáň přirozeně obsahuje mnoho iontů kovů, které jsou velmi důležité pro jejich správnou fyziologickou funkci. Jejich nerovnováha může působit jako zdroj rozvoje onemocnění centrální nervové soustavy. Ta může být způsobena patologickým procesem v buňkách, chybným transportem, ukládáním nebo jejich vlastní reaktivitou. Důležité molekuly v tomto řetězci jsou metalothioneiny, které řídí jejich funkci, distribuci a hlavně ovlivňují jejich hladinu. Ionty kovů se podílejí na vzniku proteinových agregátů. Například ionty mědi, zinku či železa jsou součástí metaloproteinů. Tyto proteiny se podílí na regulaci nervové aktivity. Konkrétně Cu/Zn superoxidodismutáza která slouží jako enzym a antioxidant, a cytochrom c oxidáza, jež je velmi důležitý enzym dýchacího řetězce. Proto je jejich koncentrace v organismu velmi přísně regulována (26). I nepatrné výkyvy jejich hladin mohou vést k různým onemocněním, odumírání buněk. Apoptóza je velmi snadno spuštěna i malou změnou koncentrace, a masivní odumírání nervových buněk je hlavním symptomem neurodegenerativních onemocnění. Zvýšené koncentrace iontů mědi a zinku lze nalézt u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou i prionózami. Stejně tak koncentrace železa je u těchto chorob vyšší. Prionové proteiny mají zásadní roli při řízení metabolismu mědi. Při navázání oktapeptidové repetice prionové molekuly na měďnatý iont vzniká komplex zabráňující přístupu dalších iontů k buňce. Molekula Zn má schopnost vytvářet můstky mezi jednotlivými prionovými molekulami, a tak s nimi tvořit neurotoxické agregáty. Dále inhibuje fibrilaci PrP^c a ovlivňuje komplex prionu s měďnatým iontem. Molekula PrP^c je schopna vázat jeden až čtyři ionty Cu^{II}. Pokud je v tkáni vysoká koncentrace tohoto iontu, dochází ke konformační změně PrP^c na strukturu bohatou na β-skládaný list (PrP^{sc}), která je odolná vůči proteázám a inhibuje fibrilaci vedoucí k vyloučení agregátů. Cu^{II} se váží na vlákna pro formy prionu a chrání je před proteolýzou. Chelatovaná forma mědi zpomaluje vznik PrP^{sc} u myších modelů odkaz. Z tohoto faktu lze usuzovat, že komplex prion-měďnatý iont může zamezit tvorbě β-skládaného listu. V místech vysokého oxidativního stresu způsobeného přítomností železnatých a železitých iontů je vyšší tvorba infekčních forem prionu. Pro objasnění všech mechanismů a možných hrozeb způsobených zvýšenou koncentrací různých iontů kovů je

důležité objasnit veškeré interakce mezi ionty a všemi částmi neuronů a jejich nejbližšího okolí v centrálním nervovém systému (21,26,38,39).

3. Diagnostika pacienta

Prionová onemocnění dnes řadíme mezi nevyléčitelné choroby. Současná medicína nezná účinný postup léčby pacienta. I přes tuto skutečnost je potřebné pacienta řádně diagnostikovat. Potvrzení prionové choroby usnadní další postup péče o pacienta (2). Zamezí se nadbytečným vyšetřením a discomfortu pacienta. V případě geneticky podmíněné formy prionového onemocnění slouží tato informace také k prevenci a sledování rodinných příslušníků. Dalším důvodem detekce přítomnosti PrP^{sc} je zabránění přenosu prionové choroby hlavně v případě dárkovství krve a tak možné transfúze nebo kontaminovanými neurochirurgickými nástroji (40).

Proces určení správné diagnózy má několik kroků. Prvním je zhodnocení klinického obrazu pacienta, jeho vnější projevy jako problém s pamětí, koordinací, třes apod. Jsou provedena vhodná laboratorní vyšetření a dle jejich výsledků určí ošetřující lékař další postup a vyloučí případně pacienty u nichž příznaky způsobuje jiný původce jako například venerické onemocnění, hormonální nerovnováha či nedostatek vitamínů (11).

3.1. Klinický obraz pacienta

Pacient s podezřením na některou z prionových chorob má četné příznaky, které nejsou vždy jednoznačné a dají se zaměnit s příznaky dalších neurodegenerativních onemocnění jako např. Alzheimerova choroba nebo Parkinsonova choroba. Prvotní projevy jsou shodné s řadou dalších onemocnění. Pacient pozoruje zvýšenou únavu, může trpět nechutenstvím, nespavostí nebo neurčitými bolestmi těla. Blízké okolí pacienta nebo i pacient sám může pozorovat i první neurologické změny jako je zhoršení pozornosti, paměti, deprese, mírný třes končetin, popřípadě špatná koordinace těla. Pacient může výrazněji hubnout. Následně se u pacientů v pozdějších stádiích mohou vyskytovat další příznaky (41).

Pro CJD jsou typické čtyři projevy, které se však mohou vyskytovat i u dalších prionóz. Prvním z nich je myoklonus, který se projevuje nepravidelnými, neovladatelnými, různě silnými záškuby svalstva. Stahy antagonistických a agonických svalů. Dalším příznakem jsou mozečkové a zrakové dysfunkce, manifestující se například výpadky zraku, zrakovými halucinacemi, nystagmu či ataxii oční bulvy. Třetím symptomem jsou pyramidové a extrapyramidové projevy, vedoucí k modifikacím svalového tonu, poruchám chůze, vyskytuje se paréza až plegie. Posledním znakem je rozvoj akinetického mutizmu. Pacient se stává méně

pohyblivým až nepohyblivým, rigidním a není schopen souvislé řeči. Avšak podobné klinické symptomy mohou mít Alzheimerova choroba, encefalitidy, tumory mozku, vaskulární demence či frontotemporální lobální demence (11,40).

3.2. Doporučená vyšetření

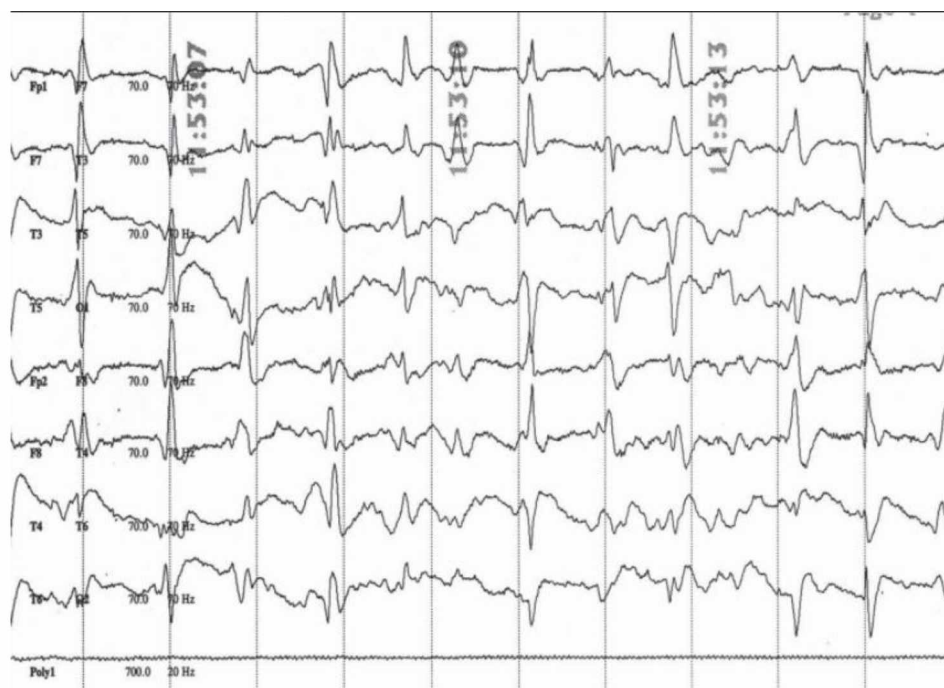
Pro správné stanovení onemocnění je nutné vyloučit nákazu pohlavní chorobou, která může mít shodné klinické příznaky s prionózami. Důležité je také vyloučit hormonální nerovnováhy a další onemocnění, která mohou být důvodem symptomů vyskytujících se v počátku onemocnění jako například únava, cefalea nebo deprese. Na základě klinických projevů se dále pokračuje v určení diagnózy. V současnosti se pracuje s modelem stanovení přítomnosti infekční PrP^{sc} v mozkomíšním moku, krvi, moči, čichové sliznici, pokožce a dalších orgánech. U vCJD byla infekční částice také objevena v sekundární lymfoidní tkáni s předstihem před klinickými příznaky (38). Diagnostikování přítomnosti infekční molekuly PrP^{sc} se skládá z neuropatologického vyšetření a imunochemického vyšetření přítomnosti patogenní formy v tkáni centrální nervové soustavy. Před stanovením přítomnosti PrP^{sc} aplikací je nutné vzorek ošetřit proteinázou K. Molekula PrP^{sc} má velmi nízkou reaktivitu v proteinkinázou K. Nejčastěji používanými vyšetřovanými metodami jsou ELISA a Western blot (39). Mezi doporučená laboratorní vyšetření řadíme kompletní krevní obraz, Stanovení obsahu elektrolytů, dále vápníku, glykémie a stanovení THS. Dalšími testy jsou zkoušky renálních a jaterních funkcí. Individuální vyšetření může být například test na syfilis, HIV, borellie nebo stanovení hladiny B12.

3.2.1. Další vyšetření

K dalším pomocným vyšetřením důležitým pro potvrzení klinické diagnózy prionového onemocnění řadíme rutinně používané EEG, vyšetření likvoru a magnetickou rezonanci. Naopak například výpočetní tomografie se běžně nevyužívá. Pacienti zde mají normální nález či nespecifickou atrofii mozku (1).

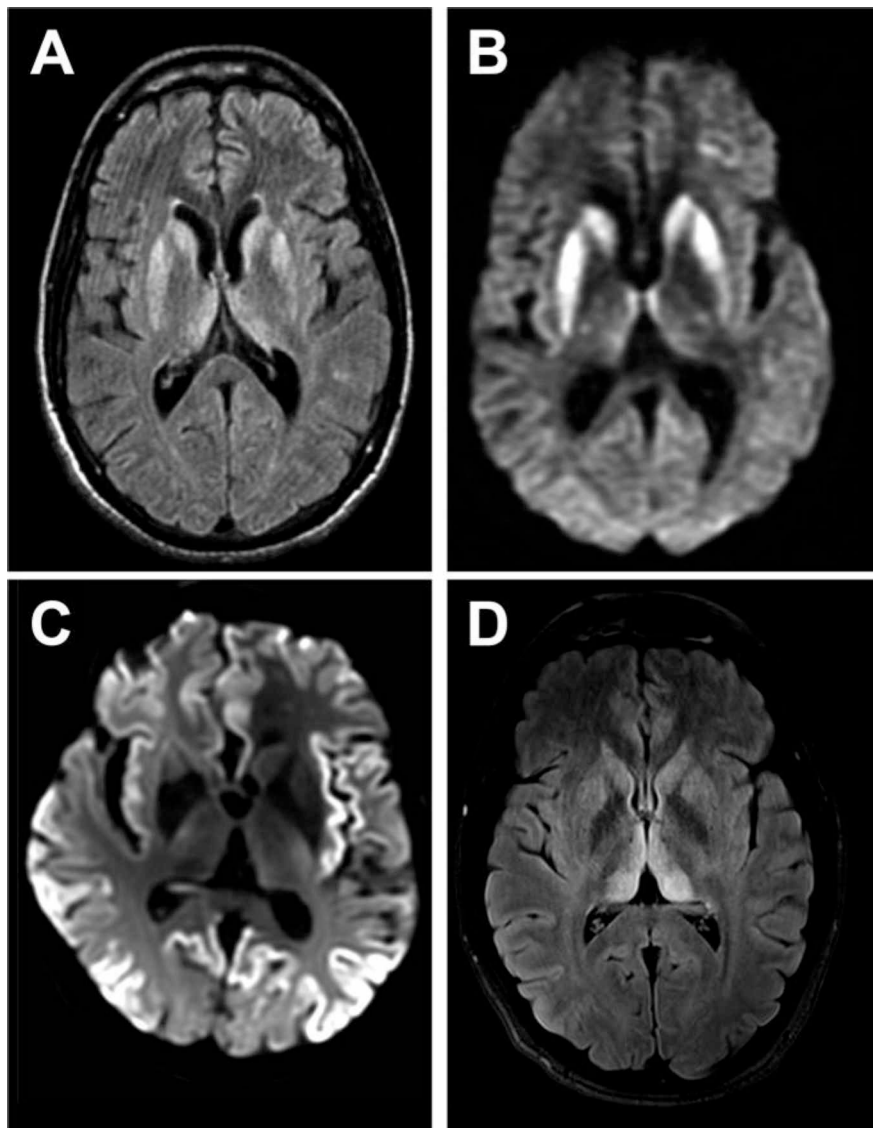
Vyšetření likvoru se zaměřuje především na protein 14-3-3. Tento protein slouží jako nespecifický marker rychlého neurálního rozpadu, jenž se uvolňuje do mozkomíšního moku v mnohých onemocněních a poraněních mozkové tkáně. Řadíme sem krvácení, záněty, tumory, ischemie atd. Při diagnostice především sCJD je nejdůležitějším paraklinickým parametrem β podjednotka proteinu 14-3-3. Jeho zvýšení spolu s velmi rychlou progredující demencí je považováno za jeden z hlavních diagnostických ukazatelů sCJD. U pomalu rozvíjejících se neurodegenerativních onemocněních jako jsou Alzheimerova choroba, demence s Lewyho tělísky nebo frontotemporální demence je vyšetření negativní. V likvoru se může stanovovat také fosforylovaný tau protein. Jeho stanovení je velmi citlivé pro důkaz prionového onemocnění (2).

Encefalografie (EEG) je zobrazovací metoda, jejímž principem je snímání elektrické mozkové aktivity pomocí elektrod umístěných na hlavě pacienta. U pacienta trpícího prionovým onemocněním je při vyšetření získán typický nález. Encefalogram se vyznačuje generalizovanými symetrickými trifazickými nebo polyfazickými vlnami, které se periodicky opakují a obsahují hrotnaté komplexy a výrazné změny v pozadí. Na obrázku číslo 3 jsou viditelné symetrické trifazické a polyfazické vlny, které se opakují v intervalech 0,5 – 2 s a trvají 100 - 300 s (42). Doporučuje se toto vyšetření provádět v průběhu onemocnění několikrát. Toto opatření by mělo zamezit špatné diagnóze. Při užívání některých léčiv například benzodiazepinů je EEG jimi modifikováno a mohlo by tak dojít k chybné diagnóze.



Obrázek 4 EEG obraz Upraveno podle (11)

Nukleární magnetická rezonance (MR) je vyšetření bez zásahu do organismu pacienta, bezbolestné s vyšší vypovídající hodnotou než například výpočetní tomografie. Typickým obrazem jsou hypersenzity v oblasti bazálních ganglií, podkorových oblastech i korových oblastech hlavně frontálně a perinsulárně. Pomocí DWI, difúzního vážení a na FLAIR sekvencích, které nalezneme u 70 % nemocných (43). U variantní formy CJD může být úspěšnost diagnostiky až 90 %. Lze pozorovat symetrické hypersignály v zadní části talamu v sekvencích FLAIR. (2) Na obrázku číslo 4 lze pozorovat zobrazení mozku pacientů CJD při různých zobrazovacích metodách. Obrázek 4A znázorňuje zobrazení metodou FLAIR. Obrázek 4B je zobrazení pomocí difúzního vážení. Na obrázku 4C je zobrazení pomocí DWI, kde je patrné kortikální zesílení u sporadické CJD. Na posledním obrázku 4D je opět zobrazení FLAIR s viditelnými pulvinarovými znaky u variantní CJD (43).



Obrázek 5 Vyšetření mozku magnetickou rezonancí. Upraveno podle (43)

3.3. Laboratorní vyšetření přítomnosti PrP^{sc}

V běžné laboratorní praxi se nejčastěji používá imunohistochemických metod. Tyto metody se používají pro potvrzení diagnózy pacienta až po smrti. Diagnostikována je mozková tkáň, protože obsahuje nejvyšší koncentrace infekčních prionů. Principem těchto metod je rozdílná sensibilita nativního prionu a infekčního PrP^{sc} k proteolýze proteináza K. Tento enzym štěpí PrP^c beze zbytku, ale z PrP^{sc} štěpí na N-konec zvlášť od C-rezistentní části, který nelze dále štěpit a označuje se jako PrP^{Res}. Za předpokladu, že prionová onemocnění způsobuje PrP^{sc}, je proto stanovována neštěpitelná část PrP^{Res}. Tato část se poté detekuje nejčastěji pomocí ELISA metody (enzymelinked immunosorbent assay), Western blot nebo PET blot (15).

Elisa metoda je metoda běžně užívaná v imunologické praxi. V tomto případě se využívá speciálně vyvinutá sendvičová ELISA k detekci PrP^{Res}. Pro stanovení přítomnosti této molekuly se používají specifické protilátky. Již bylo zmíněno, že přirozeně organismus netvoří specifické protilátky proti PrP^{sc} v odpovídajících titrech, které by mohli zprostředkovat imunologickou reakci. Tyto protilátky jsou proto připravovány v laboratorních podmínkách nejčastěji imunizací myši za specifických podmínek.

Metoda western blot se používá ke kvantitativní stanovení proteinů ve vzorku. Skládá se ze tří kroků, a to elektroforetickou separací proteinů (SDS-PAGE), přenosem separovaných proteinů z gelu pomocí blotovacího přístroje na PVDF membránu nebo nitrocelulózovou membránu a následně detekováním proteinů pomocí specifických protilátek (45).

Využívá se i postup analýzy tzv. amplifikace nově vzniklých PrP^{sc} ve vzorku s přidáním normálního zdravého mozkového homogenátu (46) nebo rekombinantního prionového proteinu. Tyto přidané látky slouží jako substrát pro zmnožení PrP^{sc}. Další metodou, která je více citlivá, je myší bioassay. Principem metody je vpravení homogenizované tkáně, kde určujeme přítomnost PrP^{sc}, do mozku indikátorových myši. V případě pozitivního vzorku tento myší exemplář po několika měsících začne vykazovat příznaky prionózy a následně umírá. Nespornou nevýhodou této metody je dlouhá doba trvání testu, finanční nákladnost a také morální hledisko (40).

3.3.1. RT-QuIC test pro vyšetření přítomnosti PrP^{Sc}

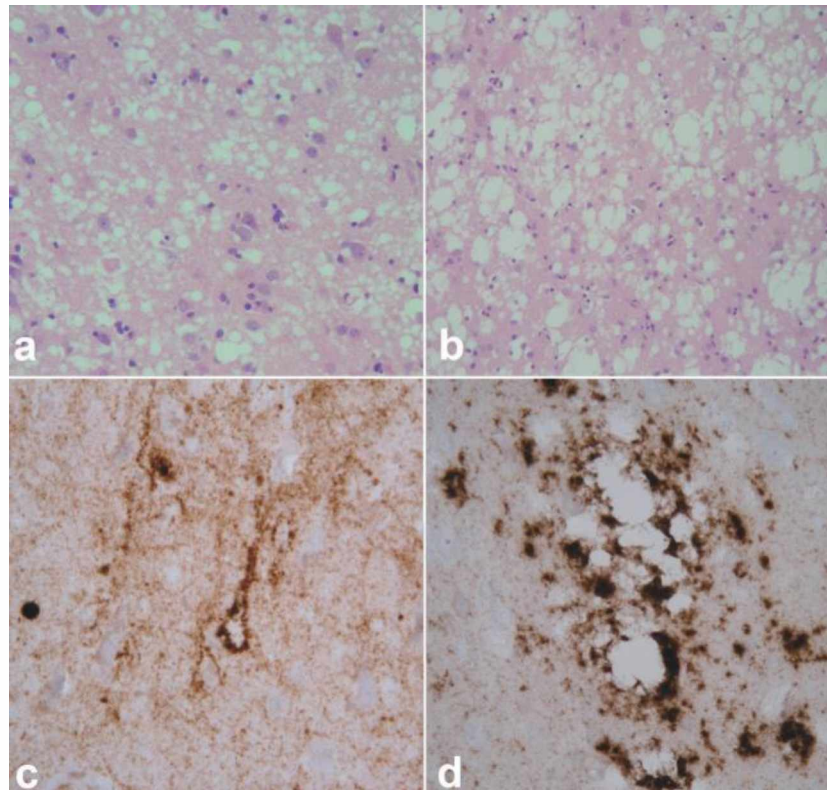
Aktuální metodou pro diagnostiku PrP^{Sc} v organismu pacienta je metoda RT-QuIC (real-time quaking-induced conversion). Vyšetřovaným materiálem je mozkomíšni mok nebo stěr z nasální sliznice (44). Tato metoda je velmi citlivá a specifická. Jejím hlavním úkolem je rozlišit CJD od jiných neurodegenerativních onemocnění nezpůsobených priony. Pro běžné používané postupy byla nutná biopsie mozkové tkáně, což je velmi invazivní zákrok. Cílem proto bylo vyvinout metodu neinvazivní. Odběr mozkomíšního moku nebo nasální sliznice pacienta přímo neohrožuje na životě a nejedná se o velký zásah do organismu vlastního v porovnání s biopsií mozku. Principem metody je stanovení amyloidových fibril vytvořených na základě přítomnosti rekombinantního prionového proteinu, který funguje jako substrát reakce a pozitivní přítomnosti PrP^{Sc} ve vzorku. PrP^{Sc} slouží jako templát, na jehož přítomnost dává za vznik dalších molekul PrP^{Sc}. Základním a velmi důležitým krokem je intenzivní a pravidelné protřepávání. Vzorek se těmito pohyby stále promíchává a může se stále dělit nově vznikající PrP^{Sc} na menší části, které pak slouží jako nový templát pro reakci. Nově vzniklé molekuly PrP^{Sc} a jejich přítomné shluky se detekují fluorescenčním barvivem thioflavinem T (ThT). Toto barvivo se váže na nově vznikající amyloidové fibrily. Výsledek odečítáme z grafu závislosti intenzity fluorescence na čase. V případě negativního vzorku je fluorescence nulová a v případě pozitivního vzorku bude křivka závislosti s časem růst (44,47).

3.3.2. Vyšetření post mortem při ověření diagnózy neurodegenerativního onemocnění

V případě, že pacientovi byli diagnostikovány klinické příznaky, které by mohly být způsobeny prionovým onemocněním či trpěl neurodegenerativním postižením neurčitěho původu nebo měl závažné psychiatrické onemocnění nezřejmé povahy, je po jeho smrti bez výjimky povinné provést pitvu, kdy vzorky nervové tkáně jsou výhradně vyšetřeny v Národní referenční laboratoři prionových chorob (NRL). Toto opatření slouží především k aktivní analýze a mapování výskytu prionových chorob. Důležité je sledování výskytu geneticky podmíněných onemocnění hlavně pro příbuzné zemřelého a k popisu výskytu nové varianty Creutzfeldt-Jakobovy nemoci. Dalším důvodem je také zamezení možných epidemiologických rizik na minimum (48).

Na obrázku 5A je zobrazena spongiformní dystrofie s malými vakuolami, úbytkem neuronů a gliózou, Obrázek je zvětšen 400x a barven hematoxylinem-eosinem. Obrázek 5B

zobrazuje spongiformní dystrofie s velkou a splývající vakuolizací, úbytkem neuronů a gliózou. Obrázek je zvětšení 200x a barven hematoxylinem-eosinem. Znárodnuje perineuronální depozita na pozadí difúzní synaptické pozitivity. Obrázek 5C představuje viditelná perivakuolární a tzv. Plaque-like depozita. Obrázek je zvětšen 400x. Obrázek 5D je preparát s navázanou protilátkou 6H4, který je zvětšen 400x (41).



Obrázek 7 Neuropatologické vyšetření mozkové tkáně prionového onemocnění. Upraveno podle (41)

3.4. Možné terapeutické postupy

Všechna onemocnění způsobena prionovými molekulami patří mezi infaustní, tedy bez dobré prognózy, smrtelná. Lze podávat pouze analgetika na zmírnění symptomů. Často se používá clonazepam pro stabilizaci myoklonu, neuroleptika pro usměrnění psychotických symptomů a valproát u epileptických paroxysmů (2). Stanovení správné diagnózy a potvrzení tak prionového onemocnění je velmi důležité pro pacienta a jeho blízké okolí. Díky diagnóze se tak může pacient vyhnout nepříjemným vyšetřením a invazivním postupům a může být zahájen proces cílené paliativní léčba se sestředěním na pohodlí, která je jedním z nejdůležitějších bodů důstojné péče o pacienty v terminálních fázích onemocnění (11).

V současné době se užívá studium tkáňových kultur pro výzkum látek s anti-PrP^{sc} účinkem. Priony nejsou imunitními látkami, protože vznikají pouze konformační změnou látky tělu vlastní. Při výzkumu in vitro bylo objeveno v posledních 20 letech několik látek s tímto účinkem. K nejvýznamnějším řadíme cyklické tetrapyroly, větvené polyaminy (40) nebo konformačně specifické protilátky. Řada těchto protilátek konkrétně reagujících s různorodými epitopy PrP^c je schopna zpomalit až úplně zamezit propagaci infekčních prionů in vitro a zamezit tak rozšíření infekce v buněčné kultuře. Další studovanou vlastností těchto protilátek je také schopnost prodloužit dobu života experimentálně nakažených zvířat. Největší úspěšnost byla dosažena podáváním protilátek profylakticky. Předpokládaný princip působení spočívá ve vazbě protilátky na PrP^c a tak upravení reakce s PrP^{sc}. Tím dochází k nižšímu výskytu nově vzniklých molekul PrP^{sc} a buňka jej může efektivněji odbourávat. Zároveň vzniká riziko tím, že není zcela známa fyziologická funkce PrP^c a můžou nastat komplikace v podobě nepříznivé reakce organismu (15).

4 Prionové molekuly v souvislosti s jinými neurodegenerativními onemocněními

Jev, který spojuje většinu závažných neurodegenerativních chorob, je tvorba proteinových útvarů v nervové tkáni nemocných. Útvary jsou tvořeny špatným konformačním uspořádáním tělu vlastních proteinů, a tudíž změnou přirozeného poměru α -helix a β -skládaného listu v sekundární struktuře, a to ve prospěch přeměny z α -helix na strukturu β -skládaného listu. Útvary často označovány jako tzv. plaky, klubka, popřípadě Lewyho útvary, se nacházejí v neuronech a dalších buňkách nervové soustavy. Jejich struktura je tvořena například β -amyloidem, PrP^{sc}, α -synukleinem a dalšími proteiny (49). Jejich dlouhodobé ukládání v tkáni způsobuje vznik zánětlivých ložisek a následné poškození či odumírání nervové tkáně.

Dalším společným znakem těchto chorob jsou klinické příznaky a inkubační doba, která je velmi dlouhá. Symptomy se projevují velmi pozvolna a onemocnění se plně rozvine až roky po nákaze či prvních nespecifických klinických příznacích. Mezi tato onemocnění řadíme především prionová onemocnění, Alzheimerovu chorobu, Parkinsonovu chorobu a frontotemporální lobární degeneraci (32). Odlišností u těchto nemocí je naopak chování PrP^{sc}. Tato molekula se chová jako infekční materiál. Má schopnost se šířit v organismu. Je přenosná z jedince na jedince. Tato vlastnost nebyl prokázána u žádné další neurodegenerativní choroby (1).

4.1. Podobnost CJD a Alzheimerovy choroby

U Alzheimerovy choroby i lidských prionových onemocnění se jedná o velmi závažná neurodegenerativní onemocnění, která mají velmi dlouhou inkubační dobu. Mechanizmy patologických změn v nervové tkáni jsou velmi podobné. V nových výzkumech byla prokázána souvislost mezi nativní prionovou molekulou a β -amyloidem, který tvoří senilní jinak zvané neuritické plaky u Alzheimerovy choroby. Kromě obdobných změn nervové tkáně je spojují i metody diagnostiky. Využívá se klinického obrazu pacienta, zobrazovacích metod např. MR nebo EEG a stanovení hladin biomarkerů nejčastěji v likvoru (50).

4.1.1. Alzheimerova choroba

Alzheimerovo onemocnění je poměrně časté onemocnění starších lidí, ale jsou případy kdy onemocnění postihne člověka v produktivním věku. Toto onemocnění lze rozdělit do tří stádií. Prvním je preklinické období, které je často asymptomatické a dochází k pozvolnému ukládání B-amyloidu a tau proteinu do nervové tkáně (51). V preklinické stádiu lze obtížně diagnostikovat onemocnění pomocí stanovení biomarkerů, ale jedná se pouze o orientační stanovení a je cílem dalšího výzkumu. Druhé stádium je charakteristické kognitivními poruchami. Typické je zapomínání výrazně častěji, než je ve věku pacienta běžné. Nejedná se však ještě o demenci. Tyto změny může pozorovat pacient sám nebo jej na ně může upozornit blízké okolí. Diagnosticky lze v tomto stádiu onemocnění určit pomocí neuropsychologického vyšetření, stanovení biomarkerů a pomocí zobrazovacích metod nejčastěji magnetickou rezonancí. Posledním stádiem je demence, která pacienta omezuje i v běžném životě a stává se tak závislým na okolní pomoci. Léčba již výrazně onemocnění neovlivní. Stanovení onemocnění probíhá dle klinických příznaků, neuropsychologického vyšetření, zobrazovacích metod a lze je potvrdit skrze stanovení hladiny biomarkerů (51).

4.1.2. Mechanismus poškození mozku u neurodegenerativních chorob pomocí konformačně pozměněných bílkovin

U prionových onemocnění jsou patologické změny způsobeny hromaděním infekční formy prionového proteinu v nervové tkáni. Konkrétní způsob poškození byl popsán v předchozí kapitole. V této kapitole jsou proto zmíněny další závažná neurodegenerativní onemocnění, která jsou způsobena konformačně přeměněnými proteiny.

Alzheimerova choroba je způsobena zvýšenou tvorbou β -amyloidu v mozku. Tato částice je tvořena. Při jejím shlukování se v mozku tvoří tzv. plaky. V místech neuronu, kde se plak vytvoří vzniká zánětlivá reakce. Při odumírání buněk jsou do jejich okolí produkovány cytokiny a další agresivní látky, které podpoří odumírání buněk v blízkém okolí. Tímto mechanismem dochází k degradaci neurální tkáně a ztrátě jejich funkcí (52).

U jedné z forem Parkinsonovi choroby se v mozku hromadí α -synuklein, který tvoří plaky v nervové tkáni a způsobuje odumírání neuronů a ztrátu jejich fyziologické funkce stejně jako je tomu u plaků β -amyloidu nebo infekčních prionů. α -synuklein může vznikat mutací genu, který ho produkuje, nedostatkem chaperonů ve tkáních nebo přítomností dalších nefyziologicky se vyskytujících látek. α -synuklein je hlavním proteinem Lewyho tělísek.

Lewyho tělíška jsou nalézána při histopatologickém vyšetření nervové tkáně. Nalézají se v těle neuronů a potvrzují diagnózu Parkinsonovy choroby nebo demence s Lewyho tělísky. Není prokázán případ šíření infekčního α -synukleinu mezi jedinci jako je to u infekčních prionů. Ale v případě přesně stanovených laboratorních podmínek má tento protein stejnou schopnost jako prionový protein, a to šíření skrze tkáň a přeměnu přirozené formy α -synukleinu na konformačně přeměněnou infekční formu, kde převládá struktura β -skládaného listu, stejně jako je to u přirozených a infekčních prionů (42).

4.1.3. Diagnostické markery společné pro neurodegenerativní onemocnění

K hlavním diagnostickým markerům, pro odlišení a určení přesné diagnózy neurodegenerativních onemocnění, řadíme stanovení β -amyloidových izoform, celkového tau proteinu, fosforylovaného tau proteinu a proteinu 14-3-3. Všechny tyto biomarkery stanovujeme v likvoru pacienta.

β -amyloid se tvoří z amyloidového prekurzorového proteinu štěpením enzymů např. β -sekretázou. Tento prekurzorový protein je fyziologicky součástí buněčné membrány. β -amyloid má dvě hlavní izoformy a to kratší formu končící valinem 40 ($A\beta$ -40) a delší formu končící alaninem 42 ($A\beta$ -42). Kratší forma se vyskytuje přirozeně ve vyšší koncentraci než delší forma a je solubilní a tělem vylučována. Delší forma ($A\beta$ -42) velmi rychle agreguje a tvoří β -amyloidové plaky. Koncentrace $A\beta$ -42 je u Alzheimerovy choroby nižší, protože je kumulován především v nově vznikajících placích v nervové tkáni. Rutinně se proto používá k diagnostikování a pro zvýšení kvality výsledku se doporučuje také stanovení poměru kratší a delší izoformy β -amyloidu (53).

PrP^c je schopná působit jako specifický receptor pro oligomery β -amyloidu. Tato vlastnost proto dává naději při dalším rozvoji diagnostiky a léčby neurodegenerativních onemocnění. Naopak není schopen navázat monomery nebo fibrily β -amyloidu. Tato vlastnost přispívá k rozvoji synaptické toxicity zprostředkované β -amyloidem a tím vyšší míře rozvoje Alzheimerovy choroby (1).

Tau protein se v organismu vyskytuje v šesti různých izoformách. Hlavní funkcí tohoto proteinu je stabilizace sítě cytoskeletu neuronu a podpora transportního systému axonu. Tau protein se váže na mikrotubuly v nervové tkáni a zprostředkovává snadnější polymerizaci. Do likvoru se uvolňuje ve zvýšené míře při akutním nebo subakutním rozpadu neuronů nebo při degenerativních procesech v souvislosti s rozvojem neurodegenerativního onemocnění. Alzheimerovu chorobu způsobuje vysoká koncentrace hyperfosforylované izoformy tau proteinu. Tato izoforma se tvoří během vývoje nervového systému. Diagnostika Tau proteinu tedy slouží k odlišení konkrétních neurodegenerativních onemocnění například Alzheimerovy choroby, kde je pozitivní a demence Lewyho tělísky, kde je negativní (53).

Závěr

Prionová onemocnění jsou velmi závažná neurodegenerativní onemocnění. Tato onemocnění jsou způsobena konformačně změněným přirozeným prionem na infekční prion. Infekční prionová částice se v nervové tkáni šíří a způsobuje odumírání jednotlivých neuronů.

Prionová onemocnění jsou rozdělena na animální a lidská. Mezi nejznámější animální onemocnění patří klusavka, která způsobuje smrtelné onemocnění koz a ovcí a bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) tzn. Nemoc šílených krav. Tato onemocnění jsou velmi invazivní. Mají dlouhou inkubační dobu, ale od prvních klinických příznaků je onemocnění velmi progresivní a zvířata jsou utracena nebo umírají na kompletní selhání organismu. Mezi nejznámější lidská prionová onemocnění řadíme Creutzfeldt-Jakobovu nemoc, která je známa ve 4 různých variantách. Dále Fatální familiární insomnie nebo GGS. Tyto choroby stejně jako u zvířecích onemocnění mají velmi dlouhou inkubační dobu. Od prvních klinických příznaků již pacientovy zbývají řádově měsíce až roky.

Efektivní diagnostika v současnosti není. Pracuje se s metodami, které jsou pro pacienta co nejméně invazivní a cílí se na zkrácení doby zpracování vzorku. Nová nadějná metoda je vyšetření RT-QuIC. Jejímž principem je zmnožení PrP^{sc} molekul přítomných ve vzorku na množství, které lze fluorescenčně detekovat. Tímto testem lze vyšetřit vzorky mozkomíšního moku nebo nasální sliznice. Stále však nejspolehlivějšími metodami jsou metody imunohistochemické například metoda ELISA nebo Western blot. Choroby jsou to nevléčitelné a při péči o pacienta proto klademe zřetel na mírnění symptomů a kvalitní paliativní péči.

Výzkum přirozené prionové molekuly se snaží objasnit podrobněji konkrétní funkce této molekuly. Svým umístěním v cytoplazmatické membráně na lipidových raftech se podílí na odbourávání oxidativního stresu. Je schopna vyvazovat dvojmocné ionty kovů a napomáhat jejich odbourávání. Hraje důležitou roli při vývoji nervové soustavy

Podobné mechanismy, se kterými se setkáváme u prionóz, nalezneme i u jiných závažných neurodegenerativních onemocnění. Kromě mechanismů působení mají tato onemocnění souvislost také diagnostice, která je velmi komplikovaná a je složena z několika metod kam řadíme metody zobrazovací například magnetickou rezonanci či encefalogram. Dále vyšetření na přítomnost sledovaných markeru. Na základě těchto informací lze konkrétněji určit typ neurodegenerativního onemocnění. Spojitost mezi všemi onemocněními by mohla objasnit nové postupy v diagnostice, léčbě či prevenci. Tyto souvislosti jsou předmětem mnohých výzkumů.

Literatura

1. **HANUSOVÁ, Z., J. KUČEROVÁ, M. FILIPOVÁ, Z. JINDROVÁ, K. HOLADA.** Prionový protein, jeho úloha v buněčné proliferaci, diferenciaci a vývoji nervové soustavy. *Cesk Slov Neurol N*, 2015, **78/111**(4): 406-412.
2. **KROMBHOLZ, R.** Prionové demence. *Psychiatrie pro Praxi*. 2014, 15 /3/, 125 – 128.
3. **NAIR, R. Rahul and K. Jerin JOHNSON.** Prions and neuro degenerative diseases . *African Journal of Biotechnology*. 2011, 10 (13).
4. Výskyt vybraných hlášených infekcí v České republice, leden - prosinec 2018. *Státní zdravotní ústav* [online]. [cit. 2019-06-12]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vyskyt-vybranych-hlasenych-infekci-v-ceske-republice-leden>
5. **KASLOW, R. A., L.R. STANBERRY and J.W. LE DUC.** Viral infections of humans: epidemiology and control. *Springer*. 2014, 3 – 1187.
6. **ARNOLD, M.E. and J.W. WILESMITH.** Estimation of the age dependent risk of infection to BSE of diary cattle in Great Britain, *Preventive Veterinary Medicine*, 2004, **66** (1-4) : 35-47.
7. Chronické chřadnutí jelenovitých (CWD = chronic wasting disease) [online]. Státní veterinární správa [cit. 2019-06-12]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/tse-bse-klusavka-scrapie-cwd/chronicke-chradnuti-jelenovitych-cwd-chronic-wasting-disease/>
8. **SIGURDSON, C. J. and M.W. MILLER.** Other animal prion diseases. *British medical bulletin*. 2003, **66** /1/, 199 – 212.
9. **HORT J., R. RUSINA et al.** Paměť a její poruchy. *Maxdorf*. 2007, 1. vyd., 424
10. **JIRÁK, et al.** Gerontopsychiatrie, *Galén* 2013
11. **RUSINA, R. and R. MATĚJ.** Prionová onemocnění. *Neurologie pro Praxi*. 2012, **13** (2), 78 – 82.
12. **MAYER, Vlastimil.** Prionové choroby člověka (so zreteľom na Creutzfeldt-Jakobovu chorobu). *Via practica*. 2007, 2007(12), 579-582.

13. **MATĚJ, R., J. NOVÁKOVÁ, J. FIALA, F. KOUKOLÍK, R. RUSINA**
 Vyšetřování proteinu 14–3–3 v mozkomíšním moku: Klinicko-patologická korelace,
Cesk Slov Neurol N 2008; **104**(71): 695–699
14. **YUSA, S, et al.** Cellular prion protein: from physiology to pathology. 2012, *Viruses*,
4: 3109-3131.
15. **DVOŘÁKOVÁ E. a K. HOLADA.** Konformačně specifické protilátky a diagnostika
 prionových chorob. *Cesk Slov Neurol N* 2012; **75/108**(3): 283–290.
16. *Neurologie 2003*. Praha: Triton, 2003. *Trendy v medicíně*. ISBN 80-725-4431-4.
17. **THODI, Ambadi Sabareesan, M.K. MATHEW and Jayant B. UDGAONKAR.**
 Mechanism of aggregation and membrane interactions of mammalian prion protein.
 2018, *BBA - Biomembranes*, 1860: 1927-1935.
18. **HEAD MW.** Human prion diseases: molecular, cellular and population bio logy.
Neuropathology 2013; 33(3): 221–236. doi: 10.1111/neup.12016.
19. CHAPTER 5 INFECTIONS OF THE NERVOUS SYSTEM: Prion Diseases
 (Transmissible Spongiform Encephalopathies). *Neuropathology* [online]. 2018, 2018
 [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: [http://neuropathology-
 web.org/chapter5/chapter5ePrions.html](http://neuropathology-web.org/chapter5/chapter5ePrions.html).
20. **LINDEN R., V. R. MARTINS, M. A. M. PRADO, M. CAMMROTA, I.
 IZQUIERDO and R.R. BRENTANI.** Physiology of the Prion Protein. *Physiol. Rev.*
 (2008).
21. **CHOI, C.J., A. KANTHASAMY and V. ANANTHARAM.** Interaction of metals
 with prion protein: possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion
 diseases, *Neurotoxicology*, 2006, **27**(5): 777-787.
22. **BROUCKOVA A and K. HOLADA.** Cellular prion protein in blood platelets
 associates with both lipid rafts and the cytoskeleton. *Thromb Haemost* 2009; **102**(5):
 966–974.
23. Discovering the Lipid Bilayer: We are taught that plasma membranes are a typical
 lipid bilayer, but how do we know this, and who figured it out? Scitable: by nature
 education[online]. 2010 [cit. 2019-01-24]. Dostupné z:
<http://www.nature.com/scitable/topicpage/discovering-the-lipid-bilayer-14225438>
24. **TAYLOR, D. R. and N.M. HOOPER.** The prion protein and lipid rafts. *Molecular
 membrane biology*. 2006, **24** /1/, 89 – 99.

25. **FORD, M. J., L.J. BURTON, R.J. MORRIS and S.M. HALL** Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience*. 2002; **113**(1):177-92.
26. **WATT, N.T. and N.M. HOOPER**. The prion protein and neuronal zinc homeostasis. *Trends in biochemical science*. 2003, 28 /8/, 406 – 410.
27. **KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich ROHM**. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
28. **BROWN, D.R., W.J. SCHULZ-SCHAEFFER, B. SCHMIT, H.A. KRETZSCHMAR** Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol*. 1997. 146: 104-112
29. **ABBOTT, Alison**. Healthy prions protect nerves: The proteins that can cause CJD have a vital role in the nervous system. In: Nature [online]. 24.1.2010 [cit. 2019-01-20]. Dostupné z: <https://www.nature.com/news/2010/100124/full/news.2010.29.html#B1>
30. **JI, H. F. and H. Y. ZHANG** "Beta-sheet constitution of prion proteins." *Trends in Biochemical Sciences* (2010). (3): 129-134
31. **FILIPOVÁ, M., K. HOLADA a R. RUSINA, R.** Nanočástice jako nosiče léků přes hematoencefalickou bariéru - naděje pro léčbu neurodegenerativních onemocnění v budoucnosti? *Cesk Slov Neurol N*, 2016, **79/112** (2): 160-167
32. **GOEDERT M, F. CLAVAGUERA and M. TOLNAY** The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 2010; **33**(7): 317–325.
33. **AGUZZI A. and A.M. CALELLA** Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* 2009; **89**(4): 1105–1152.
34. **AGUZZI A. and J. FALSIG** Prion propagation, toxicity and degradation. *Nat Neurosci* 2012; **15**(7): 936–939.
35. **COLLINS, R. Sean, a další**. Mechanism of Prion Propagation: Amyloid Growth Occurs by Monomer Addition. *PLOS*. 2004. **3**
36. **CHIESA, R.** The Elusive role of the prion protein and the mechanism of toxicity in prion disease. 2015, *PLOS Pathogens*, **11**(5)
37. **FERENČÍK, M., J. ROVENSKÝ, Y. SHOENFELD and V. MAŤHA**. Imunitní systém – informace pro každého. Praha: *Grada Publishing*. 2005, 1. vyd., 236.

38. **GDOVINDOVÁ Z.** Creutzfeldtova-Jakobova choroba. *Cesk Slov Neurol N* 2013; **76/109(2)**: 138–154
39. **HALLIDAY M. and G.R. MALLUCCI** Targeting the unfolded protein response in neurodegeneration: a new approach to therapy. *Neuropharmacology* 2014;**76(A)**:169–74.
40. **HOBZOVÁ K a O.JANOUŠKOVÁ** Tkáňové kultury pro studium prionových chorob. *Cesk Slov Neurol N* 2010; **73(4)**: 379–386
41. **ROHAN Z, E. PAROBKOVÁ, S. JOHANEDISOVÁ, F. KOUKOLÍK, R. MATĚJ, R. RUSINA.** Lidské prionové nemoci v České republice – 10 let zkušeností s diagnostikou. *Cesk Slov Neurol N* 2013; **76/109(3)**: 300–306
42. **ROTH Jan.** Parkinsonova nemoc NENÍ prionové onemocnění. *Cesk Slov Ne urol N.* 2016, **79/112**, 22-24.
43. **MEAD, Simon and Peter RUDGE.** CJD mimics and chameleons. *Pract Neurol*, 2017, **17(2)**: 113-121.
44. **ORRÚ, C. D., B.R. GROVEMAN, A.G. HUGHSON, ZANUSSO G., M.B. COULTHART and B. CAUGHEY.** Rapid and sensitive RT-QuIC detection of human creutzfeldt-jakob disease using cerebrospinal fluid. *MBio.* (2015).
45. **THACKRAY, A.M., et al.** Propagation of ovine prions from "poor" transmitter scrapie isolates in ovine PrP transgenic mice. *Experimental and molecular pathology.* 2012, **1**:92
46. **SÁÁ, P., J. CASTILLA and C. SOTO** Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J. Biol. Chem.* (2006).
47. **ATARASHI, R., K. SATOH, K. SANO, T. FUSE, N. YAMAGUHCI, D. ISHIBASHI, T. MATSUBARA, T. NAKAGAKI, H. YAMANAKA, S. SHIRABE et al.** Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat. Med.* 2011 Feb; **17(2)**: 175-8.
48. **ROHAN, Z., R. RUSINA a R. MATĚJ** Neuropatologické post mortem vyšetření mozku a míchy v deseti bodech – co může neurolog od neuropatologa očekávat při verifikaci klinické diagnózy neurodegenerativního onemocnění? *Cesk Slov Ne urol N.* 2018, **81/114(1)**, 109-114.
49. **ASHE, K.H. and A. AGUZZI** Prions, prionoids and pathogenic proteins in Alzheimer disease. *Prion*, 2013, **7 (1)**: 55-59

50. **RESSNER P, J. HORT, I. REKTOROVÁ, A. BARTOŠ, R. RUSINA, V. LÍNEK a K. SHEARDOVÁ** Doporučené postupy pro diagnostiku Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Cesk Slov Neurol N* 2008; **71/104**(4): 494–501.
51. **VYHNÁLEK, M., J. LACZÓ, T. NIKOLAIL, K. SHEARDOVÁ a J. HORT** Časná diagnostika Alzheimerovy nemoci ve světle nových diagnostických kritérií. *Neurologia pre prax*, 2012, **13**: 334-337.
52. **KEPP, Kasper P.** Alzheimer's disease: How metal ions define b-amyloid function. *Coordination Chemistry Reviews*, 2017, 351: 127-159.
53. **HORT, J., L. GLOSOVÁ, M. VYHNÁLEK, M. BOJAR, D. ŠKODA a M. HLADÍKOVÁ.** Tau protein a beta amyloid v likvoru u Alzheimerovy choroby. *Cesk Slov Ne urol N.* **70/103**(1), 30-36.