

PrP^{sc} : nové detekční metody a nové poznatky

Zpracoval: MUDr. Vladimír Plesník

Přes pochybnosti stále menšího počtu nedůvěřivců nevyvolávají tzv. prionové nemoci viry, ale abnormální forma proteinu hostitele. Rozdíl mezi obvyklou formou proteinu a její nemoc vyvolávající formou je způsoben odlišným uspořádáním proteinu. Prionové nemoci mohou být dědičné, přenosné ba i spontánně vznikají při náhodném mylném uspořádání proteinu. Je jisté, že takto vzniklé prionové proteiny (PrP) jsou jediné známé molekuly, které jsou pro tato onemocnění specifické a charakterické. Průkaz přítomnosti PrP se stal praktickým ukazatelem nemoci. Specifičnost na něm založené diagnózy je dána mírou, v jaké test dokáže odlišit normální prionové proteiny (PrP^C) od různých abnormálně uspořádaných variant, jako jsou **PrP^{SC}**, **PrP^{BSE}**, **PrP^{CJD}** a **PrP^{vCJD}**. I když není znám nezbytný počet molekul prionů, postačujících k vyvolání onemocnění lidí, pokusy na křečcích naznačují, že minimální letální dávka je asi menší než 10.000 molekul PrP^{SC}. Tento počet znamená, že jakýkoliv diagnostický test k tomu, aby zachytil jednu infekční molekulu, musí mít schopnost odhalit méně než 1 fg (<10⁻¹⁵ g) abnormálního PrP. Pokud k vyvolání nemoci stačí jen několik molekul PrP bylo by třeba, aby test byl ještě 1000x citlivější.

Současné detekční metody odlišují PrP^{SC} od PrP^C tím, že využívají jejich odlišné fyzikální a chemické vlastnosti. PrP^{SC} se obvykle prokazuje podle relativní odolnosti k degradaci K-proteázou, nebo podle nerozpustnosti v sarkosylu (anionové detergens). Nevýhoda je v tom, že tyto testy jsou pomalé a málo citlivé. Teoreticky by bylo možné využít protilátek specificky zaměřených proti PrP^{SC}.

V letošním roce bylo referováno o třech nových testech k prohloubení diagnostiky prionových nemoci. Skupina odborníků, vedená M. Maissen-ovou, uvedla, že PrP^{SC}, ne však PrP^C různých druhů živočichů, je selektivně vázán lidským plasminogenem. Zdá se tedy, že plasminogen rozeznává strukturu PrP, ne však jeho specifické sekvence. Druhým ohlášeným testem je nová selektivní precipitace pomocí kyseliny sodnofosfowolframové (NaPTA), která dokáže odlišit PrP^{SC} od PrP^C. Kombinace NaPTA s imunoblotem (Western blotting) a s enhacovanou chemiluminiscencí vede k vysoce citlivému testu, schopnému spolehlivě zjistit i velmi nízké koncentrace PrP^{SC} v homogenátu různých tkání. Hraniční hodnota detekce odpovídá asi 0,0001 koncentrace PrP^{SC} v mozku pacienta se sekčně prokázaným onemocněním vCJD. Pomocí tohoto testu vyšetřovali také jiné tkáně než z CNS. Pravidelně nacházeli PrP^{SC} v lymfatických uzlinách, mandlích a slezině pacientů s vCJD. Všechny jiné vyšetřované tkáně, s výjimkou thymu, nadledvinek a rekta, které byly pozitivní jen u některého pacienta, byly PrP^{SC} negativní. Jedno ze sedmi vyšetření sítnice a optického nervu u pacientů s vCJD bylo také PrP^{SC} pozitivní. Je třeba vyšetřit mnohem větší počet různého materiálu než bude možné říci, že priony vCJD se nachází hlavně v tkáních CNS a RES.

Překvapujícím zjištěním byl průkaz nové formy prionového proteinu, resistantní vůči proteáze, v moči křečků, krav a lidí s prionovými nemocemi. Tato nová forma, pojmenovaná objeviteli jako **UPrP^{SC}**, je specifická pro prionové infekce, neboť je nalézána jen u infikovaných jedinců, ale chybí u zdravých kontrol. Pravděpodobný význam nálezu UPrP^{SC} pro diagnostiku prionových nemocí byl sledován na experimentálně infikovaných křečcích: ve vzorcích moče byl prokazován mnohem dříve, než se objevily známky nemoci. Na rozdíl od PrP^{SC} z mozkové tkáně, UPrP^{SC} izolovaný z moče infikovaných křečků, při podání stejné dávky vnímavým křečkům, nevedl k poškození CNS. Ačkoliv křečci po inokulaci UPrP^{SC} zůstali klinicky zdraví, vylučovali močí UPrP^{SC} a v mozku nejméně jednoho se nacházel

proteáza-resistentní prionový protein. Je možné, že UPrP^{SC} je infekční, ale že jím vyvolané „onemocnění“ má delší inkubaci než skrejpi u křečků, nebo že jde o dvě klinicky odlišná onemocnění. Pokud ovšem UPrP^{SC} je infekční, co to znamená pro přenos prionových infekcí u lidí a zvířat ?

Patogeneze prionových nemocí bývá u různých hostitelů a kmenů prionů odlišná. Je jisté, že patologie vCJD se podstatně liší od od jiných forem CJD. V tonsilách pacientů s vCJD se pravidelně nachází zvláštní typ PrP^{SC}, označovaný jako typ 4t. Proto biopsie tonsil lze užít již in vivo k diagnostice vCJD. Dosud u všech pacientů s pozitivní biopsií madlí byla vCJD prokázána sekčně, nebo následným průběhem nemoci, odpovídající obrazu vCJD. Naopak, u všech pacientů s negativní biopsií madlí, byla vCJD vyloučena a zjištěno jiné onemocnění. Vzhledem k přednostnímu postižení lymforetikulárních tkání lze PrP^{SC} prokázat v inkubační době poměrně brzy, ještě před zjištěným poškozením CNS. Na tomto zjištění je založeno několik studií, zaměřených na vyšetřování PrP^{SC} v materiálu odebraném při tonsilektomiích a apendektomiích. Výsledky by mohly posloužit k časné detekci vCJD.

Obavy z toho, že nemalý počet lidí prožívá inkubaci vCJD, vedou také k domněnce, že je možný častý iatrogenní přenos infekce. Byť chybí epidemiologické důkazy o riziku přenosu CJD transfuzemi krve, zjištění, že k pronikání prionů do CNS jsou nezbytné B lymfocyty, jiná patologie vCJD a neznámá, ale potenciálně vysoká prevalence preklinických stavů vCJD, vedlo úřady v Británii k opatřením, majícím snížit případný přenos krví a krevními produkty. Obavy vzbuzuje také možnost iatrogenního přenosu kontaminovanými chirurgickými nástroji. Priony mohou přežít obvyklé sterilizační postupy. Je známo, že klasickou CJD lze přenést neurochirurgickými nástroji. Jsou náznaky toho, že riziko nákazy klasickou CJD představuje i anamnestický údaj o podstoupení operace na gastrointestinálním traktu. Sondy z nerezů po zavedení do homogenátů mozku vážou na sebe priony a po implantaci myším snadno tak přenáší infekci. Doporučované hojnější užívání nástrojů na jedno použití u některých procedur naráží na nedostatek poznatků o přítomnosti prionů v různých tkáních.

Jedinou možností formálního průkazu nakažlivosti je pokus na zvířeti. Ten však může být značně ovlivněn specifickou druhovou bariérou. Používá se proto transgenních myší, které exprimují místo myšního lidský PrP. Jsou pak vysoce vnímavé k naze všemi typy prionů klasické CJD. Bohužel se ukázalo, že transgenní myši priony vCJD tak snadno nepřenáší. To je velká překážka průkazu nižšího stupně nakažlivosti.

Rozsáhlé studie patologie BSE u experimentálně infikovaných krav využívaly k průkazu nakažlivosti pokusů na konvenčních myších. Následkem druhové bariéry mezi krávy a myši se ukázalo, že k infekci myši dochází až po dávce 1000 infekčních jednotek pro krávu. Pokusy na myších byla zjištěna nakažlivost pouze nervových tkání (mozek, mícha, zadní kořeny míšní a spinální ganglia). Po půlročním intervalu od expozice byl zjištěn také přenos tkání terminálního úseku střeva telat a asi i kostní dřeviny ze sterna.

Kolektiv pracovníků vedený Wadsworthem vypracoval metodu imunoblotu snadno zjišťující PrP^{SC} ve všech homogenátech mozků od vCJD, včetně těch, jejichž inokulace transgenním myším nevedla u nich k onemocnění. To svědčí o mnohem větší citlivosti této metody než má pokus na myších.

Pro odhalení klinicky němé infekce vCJD je nejlepším způsobem biopsie madlí. Průkaz PrP^{SC} se daří již při 0,1% koncentraci maximální hodnoty, nalézané v terminálním stádiu nemoci. Kupodivu snaha o detekci PrP^{SC} v tkáni apendixu (vyšetřeno jen 5 vzorků) byla dosud marná. Podařilo se také touto citlivou detekční metodou prokázat přítomnost PrP^{SC} v nízké koncentraci (10^{-4} až 10^{-5} maximální hladiny v mozku) v jiných vyšetřovaných tkáních téhož pacienta: v brzlíku, nadledvinkách a rektu. Je možné očekávat, že také tyto tkáně obsahují PrP^{SC}, ale v množstvích, která jsou pod limitem zachytnosti použité metody. Z toho vyplývá riziko iatrogenního přenosu PrP^{SC} nástroji, užívanými při běžné rektoskopii. Také bioptická vyšetřování dalších tkání gastrointestinálního traktu, obsahujících větší podíl

lymfatické tkáně, představují riziko iatrogenního přenosu prionů vCJD. Na druhé straně v řadě chirurgicky důležitých tkání (srdce, plíce, pankreas, ledviny, játra a kůže) se PrP^{SC} nedaří prokázat. Velké obavy v současnosti z rizika iatrogenního přenosu při operacích očí vyvolává ukládání PrP^{SC} v očích pacientů s vCJD. Přes zdokonalování metod detekce PrP^{SC} v různých tkáních pacientů s vCJD je důležité si uvědomit, že negativní nález tohoto proteinu nemusí znamenat chybění nakažlivosti tkáně.

Všichni pacienti s vCJD, vyšetření skupinou Wadswortha, měli stejný genotyp PRNP a byli homozygotní co do přítomnosti methioninu na pozici 129. Polymorfni variabilita PRPN a jiných lokusů genotypu může mít vliv na patogenezi. Fenotypové varianty infekce lidí BSE mohou mít jinou distribuci v tkáních a tak měnit jejich předpokládanou nakažlivost.

Použitá literatura:

- Bolton, David C.: Prions and proteins: distinguishing between conformations. Lancet, Vol. 358, 2001, č. 9277, s. 164-5.
- Wadsworth, J D F., Joiner, S., Hill, A.F. a ost.: Tissue distribution of protease resistant prion in variant Creutzfeldt-Jacob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. Lancet, Vol. 358, 2001, č. 9277, s. 171 – 180.

Poznámky překladatele:

Pod názvem „Nemocní trpící nemocí BSE již mají naději“ uveřejnila Svoboda (15.8.2001) zprávu, že nositel Nobelovy ceny za objev prionů, S. Prusiner se svým pracovním týmem z kalifornské univerzity v San Francisku, informoval Americkou akademii věd, že zjistili dvě molekuly, které by mohly sloužit k léčbě vCJD. Jde prý o jedno antimalarikum a o neuroleptikum. Prusinerovi bych i věřil, ale zprávy z denního tisku neoplývají věrohodností.

Překvapivou informaci zveřejnil také vysoce renomovaný, odborný tisk Nature, 408, 2000, s. 479-483. Podle zprávy, kterou komentuje ve Vesmíru (to je také náš výborný časopis) Jan Černý, se švýcarskému týmu Aguzzi-ho podařilo nalézt molekulu, která specificky váže infekční PrP^{SC}. Má jí být plasminogen, neaktivní forma enzymu, z níž po rozštěpení urokinázou vzniká aktivní plasmin-enzym štěpící proteiny. Ten hlavně reguluje srážení krve, neboť ve spojení s další proteázou – elastinem, je schopen štěpit fibrin. Systém plasminogen s urokinázou hraje asi také významnou roli v nervové tkáni. Vazebná doména lyzinu, která je částí molekuly plasminogenu je schopna sama o sobě specificky vázat infekční formu PrP. Mutace v genu kódujícím PrP, při níž kyselinu glutamovou nahrazuje lyzin, vede ke geneticky založené odolnosti proti prionové nemoci. To by značilo, že tyto osoby se nikdy nenakazí BSE. Ukázalo se, že plasminogen specificky váže jen „infekční“, ne však „normální“ formu prionového proteinu. Objevu je možné využít k detekci původce BSE, možná i k inaktivaci infekční krve odstraněním plasminogenu, na nějž je navázán infekční prion. Ten vazbou na plasminogen v mozku asi lokálně brzdí štěpení bílkovin plasminem. Štěpení je však potřebné pro přestavbu nervových zakončení, nezbytného předpokladu pro paměť. Mozek pak ztrácí schopnost regenerace, přizpůsobivosti a učení. To by mohlo vysvětlovat vznik demence při prionových nemocech. (Vesmír, Vol.60, 2001, č. 7, s. 377).

Dne 28.6.2001 doporučila Komise pro transmisivní spongiformní encefalopatie (TSEAC) americkému úřadu FDA další omezení odběrů krve od osob, které pobývaly v Evropě a mohly se tam infikovat BSE. Nemá být používána krev od dárců, kteří žili po roce 1980 celkem 5 a více let **v kterémkoliv evropském státě** (vyjma Británie), a od osob, které v roce 1980 a později dostaly transfuzi krve v Británii. Tímto jsou rozšířeny současné směrnice FDA zakazující dárcovství krve osobám, které pobývaly v letech 1980 až 1996 v Británii po dobu šesti měsíců, či delší. Doporučení bylo přijato s velkými rozpaky a protesty, neboť je založeno na teoretickém riziku infekce vCJD, proti němuž stojí reálné riziko nedostatku krve a krevních derivátů. Americký Červený kříž, obhospodařující téměř polovinu krevních zásob

v USA, však přijal v srpnu 2001 ještě přísnější zásady výběru dárců krve: krev nemá být odebrána osobě, která strávila v Británii v r.1980 a později kumulativně 3 a více měsíců, nebo po roce 1980 žila v kterékoli evropské zemi šest a více měsíců, nebo po roce 1980 dostala v Británii transfuzi krve. Americké krevní centrum (ABC), dodavatel druhé poloviny krevních produktů, zvolilo mírnější opatření: zákaz odběru krve u osob, které pobývaly v Británii v roce 1980 a později tři a více měsíců, a u osob, které žily po dobu deseti a více let ve Francii a Portugalsku (státy s nejvyšším počtem případů BSE mimo Anglii).

Je známo, že asi 100 osob, z toho 95 v Británii, 3 ve Francii a 1 v Portugalsku zemřelo na vCJD. Předpokládá se, že se tato nemoc přenáší konzumací hovězího masa od krav s BSE. Dosud nebyl zjištěn žádný případ přenosu vCJD transfuzí krve, ale teoretickou možnost takového přenosu nelze vyloučit. Dosud není znám žádný test k odhalení původce vCJD u lidí nebo v jejich krvi. (JAMA, Vol.286, 2001, č.4, s. 408).

Rád také upozorňuji čtenáře na výborné články o vCJD, uveřejněné ve Zprávách CEM (SZÚ Praha), č. 6/2001, s. 234-6 a v čísle 7/2001, s. 298. Zprávy si stále udržují vysoký standart a aktuálnost, stojí za pravidelné sledování.