

Úvod

Prionové ochorenia sú smrteľné, neliečiteľné a zároveň prenosné degeneratívne ochorenia centrálneho nervového systému postihujúce ľudí aj zvieratá. Patologický glykoproteín PRION (PrP^{Sc}), prítomný v každom postihnutom organizme (Prusiner, 2001), má svojho fyziologického predchodcu, bunkový prionový proteín (PrP^C), zakódovaný v prionovom *PRNP* géne, ktorý sa u človeka nachádza na 20. chromozóme. Mechanizmus patogenézy ochorenia, dôvod, prečo sa konformačnou zmenou z normálneho bunkového proteínu vytvorí v organizme patologický prion, v súčasnosti stále nie je známy. Najčastejšou ľudskou prionovou chorobou je Creutzfeldtova-Jakobova choroba (CJCh).

Creutzfeldtova-Jakobova choroba má dva varianty:

- klasický variant,
- nový variant (vCJCh) súvisiaci s epidémiou bovinnej spongiformnej encefalopatie – choroby „šialených kráv“ (Will et al., 1996).

Klasický variant CJCh sa vyskytuje nezávisle od spomínanej zoonotickej nákazy. Prvýkrát bol opísaný už v roku 1920 a známe sú jeho tri formy:

- sporadická forma (sCJCh) – pri sCJCh nie je známa príčina premeny normálneho bunkového prionového proteínu na patologický prion, vo svete tvorí táto forma 85 % všetkých ľudských CJCh (Ladogana et al., 2005),
- genetická forma (gCJCh) – v tomto prípade je ochorenie asociované s mutáciami génu pre prionový proteín, celosvetovo tvorí 10 – 15 % prípadov (Masters et al., 1979; Pocchiari, 1994; Alperovitch et al., 2002; Kovacs et al., 2005),
- iatrogénna forma (iCJCh) – ide o horizontálny interhumánny prenos, ochorenie sa preniesie na zdravého človeka napr. počas chirurgických operácií v dôsledku kontaminácie chirurgických nástrojov alebo kontaminovaného tkaniva, orgánov pri transplantáciách (Brown et al., 2000; Will, 2003).

Klinický obraz CJCh sa začína prejavovať zmenami nálad, poruchami spánku, pridáva sa postupný rozvoj demencie a ataxie. Niekedy

možno pozorovať somatické (strata telesnej hmotnosti), ako aj psychické príznaky (depresia). V priebehu niekoľkých týždňov sa vyvinie ťažká demencia s poruchami rovnováhy, chôdze, zraku. Ochorenie sa v dôsledku pridruženej infekcie, najčastejšie pľúc alebo obličiek, do niekoľkých mesiacov od prvých príznakov končí smrťou.

Klinické fenotypy ľudských prionových chorôb sa líšia a táto variácia je čiastočne určená polymorfizmom na kodóne 129 génu pre prionový proteín, ktorý môže mať homozygotnú (na oboch alelách je prítomný metionín Met/Met alebo valín Val/Val) alebo heterozygotnú (metionín/valín) formu. Homozygotita Met/Met je spojená so skrátenou inkubačnou lehotou a zvýšenou citlivosťou na iCJCh, sCJCh a vCJCh (Palmer et al., 1991; Collinge et al., 1991; Prowse et MacGregor, 2002).

CJCh sa vyskytuje zriedkavo na celom svete, evidovaní sú približne 1 – 2 pacienti na milión obyvateľov ročne. Ako už bolo spomenuté vyššie, najrozšírenejšou formou vo svete je sporadická forma, pri ktorej nie je známa príčina vzniku – premeny normálneho bunkového prionového proteínu na patologický prion.

Na Slovensku je situácia diametrálne odlišná. Výskyt ochorenia charakterizuje unikátny ložiskový, výrazne zvýšený nález genetických prípadov, ktoré majú mutáciu prionového génu na kodóne 200 (Mitrová et Belay, 2002). Mutácia sa označuje skratkou E200K, keďže pri nej dochádza k substitúcii kyseliny glutámovej (E) za lyzín (L).

Pacienti a metódy

Prospektívne vyšetrenie CJCh na Slovensku sa vykonáva od roku 1973. Vzorky periférnej krvi a likvoru klinicky suspektných pacientov sú zasielané z neurologických a infekčných kliník do Národného referenčného centra pre prionové choroby a pomalé vírusové neuroinfekcie, ktoré je súčasťou Oddelenia pre prionové choroby LF SZU v Bratislave. V rokoch 2007 – 2022 bolo vyšetrených 3 127 vzoriek krvi a 3 155 vzoriek mozgovomiechového moku. V prípade úmrtia pacienta so suspektnou CJCh bolo do NRC pre prionové choroby zasielané mrazené a fixované tkanivo CNS na definitívnu laboratórnu diagnostiku. V rokoch 2007 – 2022 bolo v rámci definitívnej diagnostiky vyšetrených 403 vzoriek.

Vzorky krvi boli podrobené molekulárno-biologickej analýze na detekciu mutácie E200K. Z krvi suspektných CJCh pacientov bola izolovaná DNA fenol-chloroformovou extrakciou. Po získaní genomickej DNA bol kódujúci úsek *PRNP* génu (Mendelian Inheritance in Man – MIM kód génu: 176640) cielene amplifikovaný metódou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). PCR produkt bol následne štiepený špecifickými reštrikčnými endonukleázovými enzýmami (New England BioLabs): BsmAI na detekciu bodovej mutácie na kodóne 200.

Vo vzorkách likvoru bola stanovovaná prítomnosť proteínu 14-3-3 biochemickou metódou western blot. Proteín 14-3-3 patrí do skupiny mozgovoderivovaných proteínov. Vyskytuje sa prevažne v neurónoch, zapája sa do regulácie bunkového cyklu a apoptózy. Prítomnosť proteínu 14-3-3 v likvore je spojená s poškodením nervových buniek, a teda stanovenie špecifickej izoformy v likvore je charakteristické pre rôzne neurodegeneratívne ochorenia – je to marker smrti nervovej bunky. Ide o nešpecifickú, no senzitivnú metódu, ktorú Svetová zdravotnícka organizácia zaraďuje medzi diagnostické kritériá pravdepodobnej Creutzfeldtvej-Jakobovej choroby.

Metóda je založená na elektroforetickom delení proteínov (SDS/PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) na základe rôznej molekulovej hmotnosti, ich preblotovaní z gélu na PVDF (polyvinylidénfluoridový) membránu a následnej detekcii po inkubácii v primárnej, sekundárnej protilátke a chemiluminiscenčnom substráte.

Definitívna diagnostika zahŕňa histopatologické, imunohistochemické a biochemické vyšetrenie mozgového tkaniva. Histopatologická diagnostika, t.j. hodnotenie mikroskopických zmien a lézií v cieľovom orgáne – CNS, je najstaršia diagnostická metóda animálnych aj ľudských prionových chorôb. Vo fixovanom mozgovom tkanive bol vyhľadávaný histopatologický nález typický pre prionové ochorenie: spongióza neuropilu, astrocytóza (hypertrofia a hyperplázia astrocytov) a zánik neurónov, všetko primárne v sivej hmote mozgu. Následne sa prítomnosť PrP^{Sc} vo fixovanom tkanive detegovala špecifickými diagnostickými