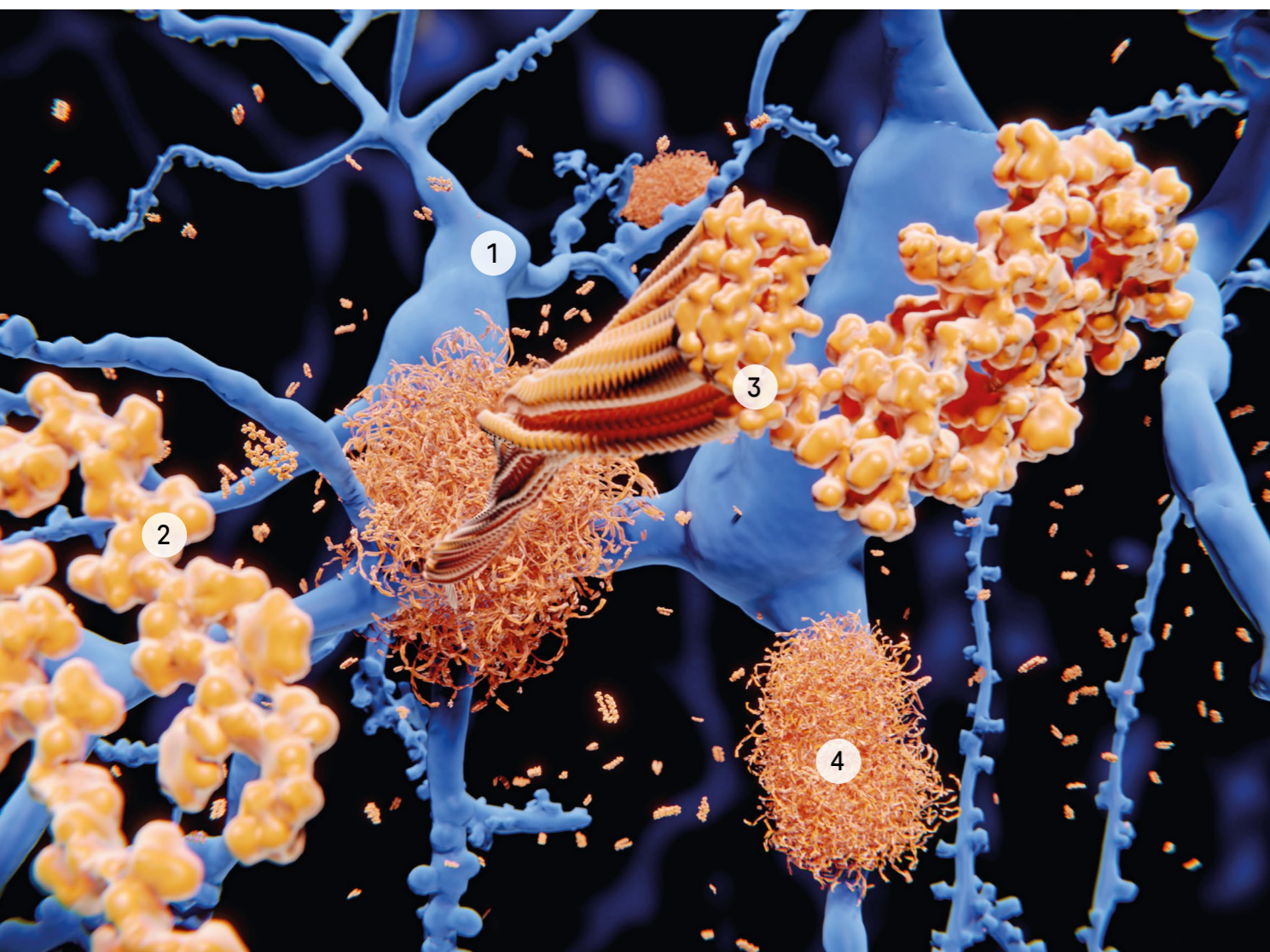


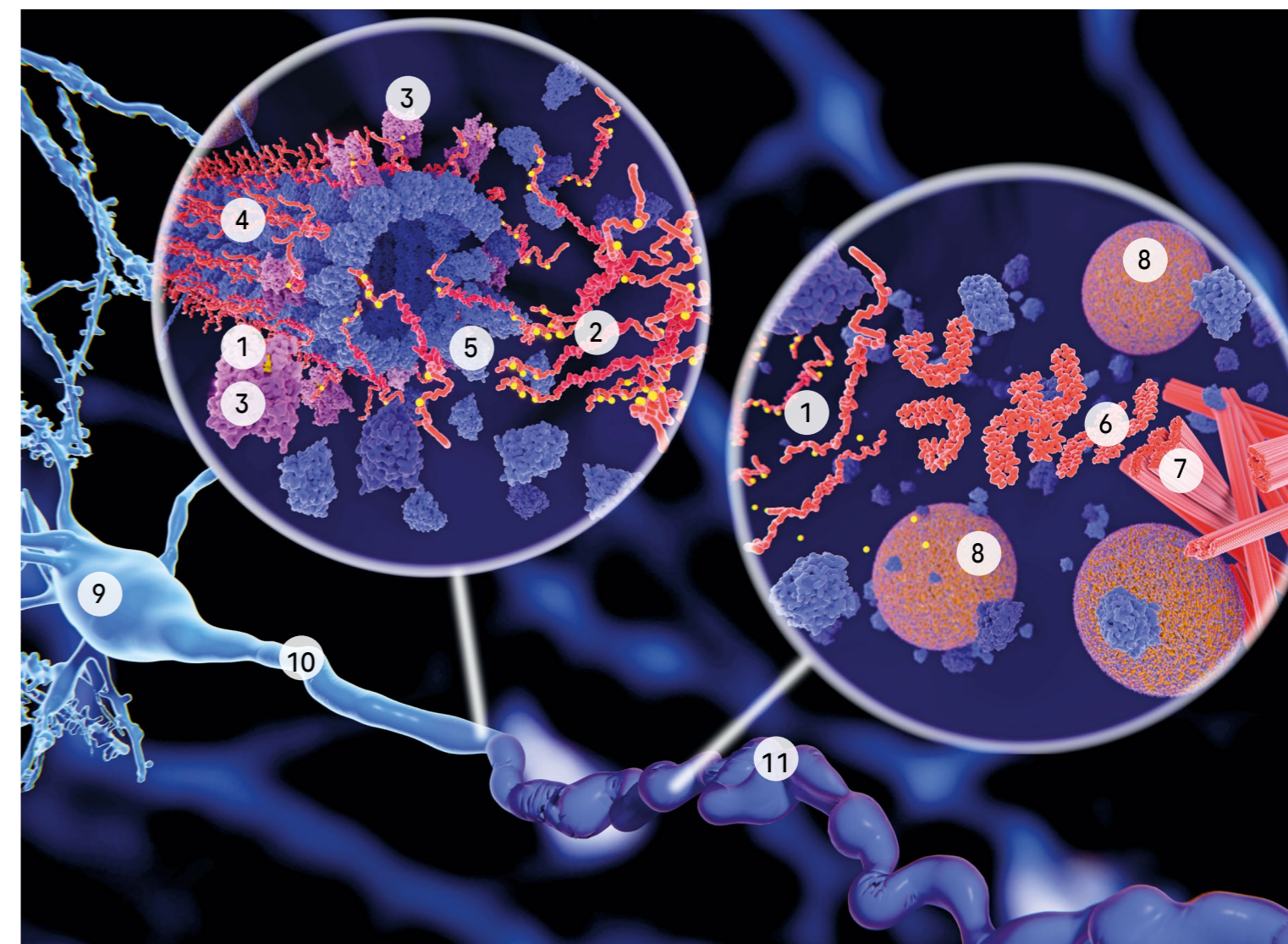


Mechanismus působení β -amyloidu a tau proteinu u Alzheimerovy choroby

Počítačové ilustrace mechanismu působení s komentářem. Autor: J. GAERTNER. <https://stories.sciencephoto.com/portfolio/juan-gaertner/>. Zdroj: SCIENCE PHOTO LIBRARY



> **Amyloid beta.** Ilustrace procesu vedoucího k tvorbě amyloidních plaků na neuronech (1, modře). Zde zobrazené buněčné děje probíhají poté, co je amyloidní prekurzorový protein rozštěpen gama a beta sekretázami. Vzniklý amyloid beta (2, oranžová) opouští membránu a agreguje (3), přičemž tvoří nerozpustné husté plaky (4), které jsou charakteristickým znakem Alzheimerovy choroby. Amyloid beta je toxický, vyvolává synaptickou dysfunkci, narušuje konektivitu a souvisí s odumíráním neuronů ve specifické oblasti mozku.



> **Tau protein.** Výřezy znázorňují dva způsoby dopadu patologické fosforylace (1, žlutá) proteinů tau (2, červenooranžová) kinázami (3, modrofialová) na nervové buňky. Tau protein přirozeně spoluutváří a stabilizuje strukturu mikrotubulů (4, výřez vlevo). V důsledku hyperfosforylace ale ztrácí tuto schopnost, což způsobuje rozpad mikrotubulů (5). Uvolněný protein agreguje (6, výřez vpravo) do nerozpustných vláken (7) a tvoří tzv. neurobrilární klubka, která se typicky nacházejí v dendritech a v buněčných tělech nervových buněk. Neurony tím ztrácejí svůj tvar i funkci a posléze se rozpadají. Přerušeno je také transport synaptických vezikul (8, oranžovomodré kuličky, výřez vpravo). Hlavní obrázek znázorňuje nervovou buňku (9, neuron, modře, vlevo dole) a její axon (napříč dole), zobrazený v normálním (10) a deformovaném (11) stavu.

Alzheimerova choroba (AD) se vyznačuje rozsáhlou neurodegenerací, zánětlivým procesem a zhoršením kognitivních funkcí. Patologicky je charakterizována hromaděním extracelulárního amyloidu a intraneuronálních klubek tvořených hyperfosforylovaným tau. Ačkoliv onemocnění bylo popsáno Aloisem Alzheimerem před více než sto lety, stále zůstává zcela nejasným klíčovým mechanismem, který spouští procesy na různých úrovních a jejich kauzalitě. Vedle celé plejády genetických faktorů od potvrzené asociace s apolipoproteinem E, genů ovlivňujících metabolismus amyloidu beta až po cholesterolový metabolismus, funkčnost synapsí a membránové procesy epidemiologické studie poukázaly na významnou korelaci vzniku a rozvoje AD s přítomností kardiovaskulárních rizikových faktorů. To vedlo ke vzniku tzv. vaskulární hypotézy. Rizikové faktory, jako je hypertenze, diabetes

a hyperhomocysteinémie, významně zvyšují pravděpodobnost rozvoje AD, což naznačuje jejich přídavný nebo dokonce synergický účinek. Narušení normální hemodynamiky mozku způsobuje např. chronickou mozkovou hypoperfuzi (CCH), ischemii nebo hypoxii. Následný oxidační stres, úzce spojený se zánětem, může podle této hypotézy chronickým působením vést k abnormální agregaci amyloidu a tau proteinu. Příčinná souvislost těchto vaskulárních rizikových faktorů na vznik AD však zůstává z velké části neznámá.

Sanny Scheffer, Dorien M.A. Hermkens, Louise van der Weerd, Helga E. de Vries and Mat J.A.P. Daemen Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2021;41:1265–1283. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.311911>



RNDr. Miroslava Beňovská, Ph.D.^{1,2}

Ing. Martina Podborská, Ph.D.^{1,2}

¹ Ústav laboratorní medicíny – OKB FN Brno

² Katedra laboratorních metod LF MU

Úvod

V srpnu roku 2021 byly na český trh uvedeny reagentie 2. generace pro automatizované metody Roche. Výhodou analýzy tau proteinu celkového (tTau), tau proteinu fosforylovaného (pTau) a beta amyloidu (1-42) (β -amyloid) reagentiemi 2. generace je možnost provedení na všech široce dostupných imunochemických modulech **cobas e**, zajišťující snadné zavedení do běžného laboratorního provozu. Ve srovnání s reagentiemi předchozí generace došlo k největší změně u stanovení β -amyloidu. Metoda byla restandardizována na IFCC CRM, byl zvýšen rozsah měření (z 200–1 700 na 150–2 500 ng/l). Cut-off hodnota se u β -amyloidu změnila z 1 000 na 1 030 ng/l. Dále byl zjednodušen preanalytický protokol. Odběr i analýzy se provádějí ve zkumavkách pro CSF kat. č. 63.614.625 (Sarstedt) a je možné standardně pracovat s čerstvým vzorkem. Výsledky jsou konzistentní s PET.^{4,6}

Vzhledem k tomu, že na našem pracovišti byly do 8/2021 používány reagentie 1. generace a měli jsme zájem využít výhod nových setů, provedli jsme srovnání obou metod a výsledky statisticky vyhodnotili.

Materiál a metoda

Stanovení tTau a pTau 1. generace bylo prováděno na přístroji **cobas e 411**

Stanovení β -amyloidu (1-42), tau proteinu celkového a tau proteinu fosforylovaného – srovnání reagentií Roche 1. a 2. generace

Stanovení beta amyloidu (1-42), tau proteinu celkového a tau proteinu fosforylovaného je využíváno při diagnostice Alzheimerovy choroby a jiných neurodegenerativních onemocnění. Kromě automatizovaných metod¹ je laboratorně prováděna především ELISA² a multiplexové techniky³.

a stanovení β -amyloidu na přístroji **cobas**[®] 6000, modul **e 601** (v Lab Med spol. s r.o., Brno). Metody tTau, pTau i β -amyloid 2. generace byly měřeny na přístroji **cobas**[®] 8000, modul **e 801**. Projekt byl schválen Etickou komisí FN Brno (č. j. 01-090119/EK) v rámci Start-up grantu. Katalogová čísla

jednotlivých souprav jsou uvedena v tab. 1. Principem testů je elektrochemiluminiscenční nekompetitivní analýza. Srovnání bylo provedeno na souboru 67 vzorků a zhodnoceno za použití Passing-Bablokovy regresní analýzy a Bland-Altmanova rozdílového grafu (sw MedCalc, verze 12.5.0).

Produkt	Katalogové číslo – Gen1	Katalogové číslo – Gen2
beta-Amyloid (1-42)	06986811 190	08821941 190
Total-Tau protein	07357036 190	08846685 190
Phospho-Tau protein	07356994 190	08846715 190

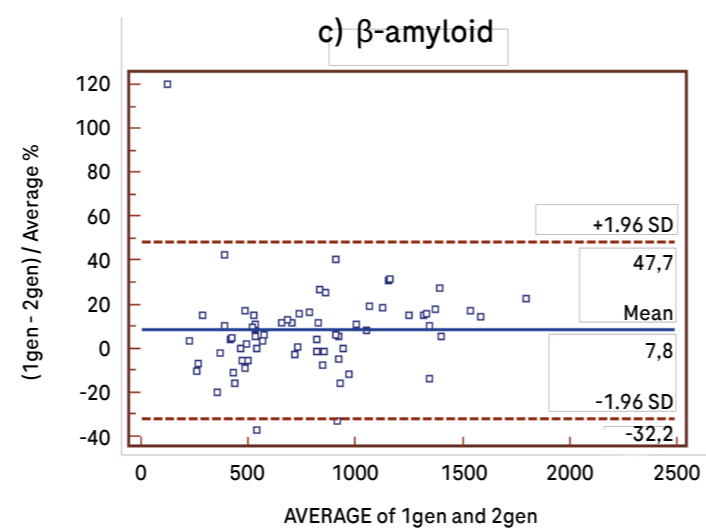
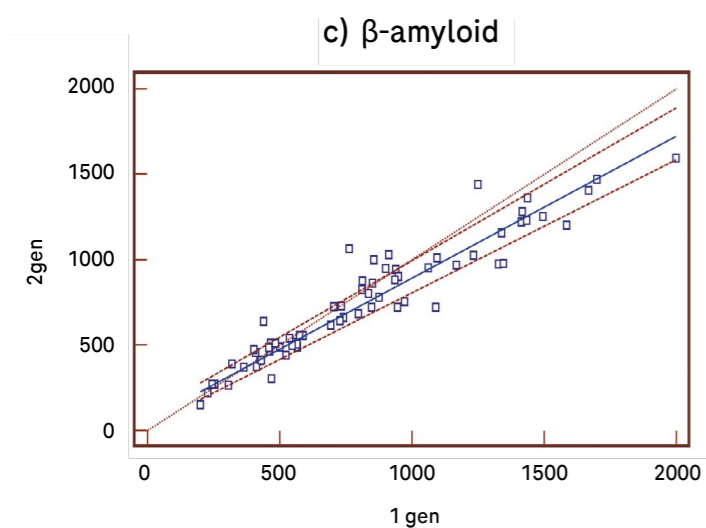
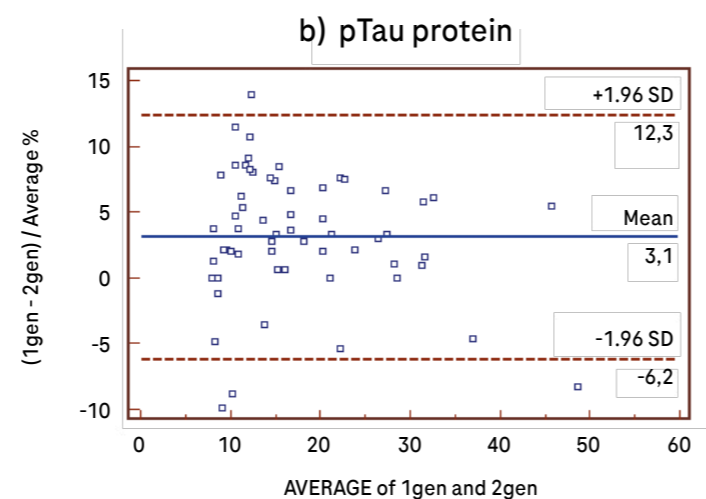
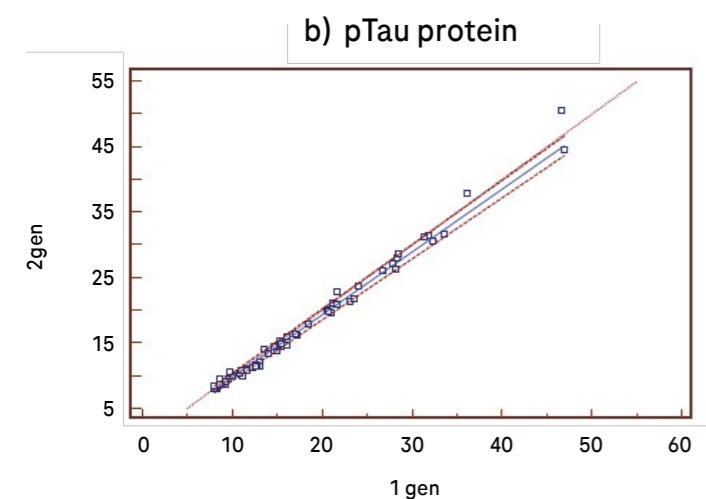
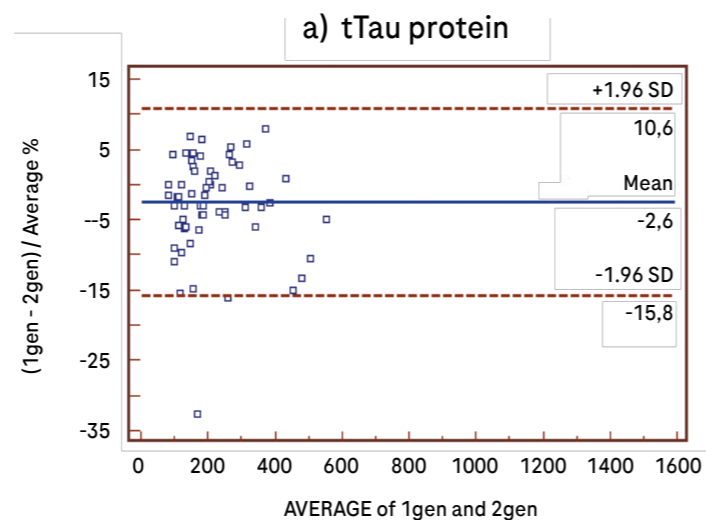
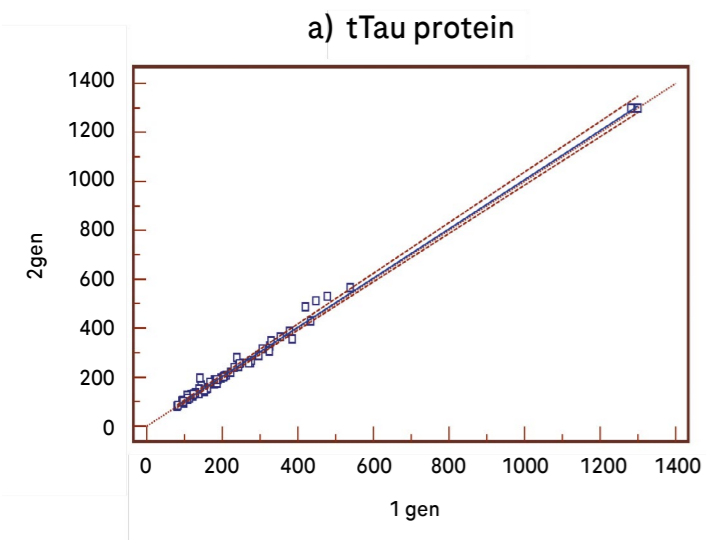
> **Tab. 1:** Katalogová čísla použitých reagentií

Parametr	Rovnice regrese	95% CI		P
		Úsek na ose y	Směrnice	
tTau	$y = 1,37 + 1,01 x$	-2,326 - 5,334	0,988 - 1,033	>0,10
pTau	$y = 0,243 + 0,956 x$	-0,177 - 0,510	0,935 - 0,983	<0,01
β -amyloid	$y = 62,87 + 0,83 x$	27,190 - 100,111	0,7778 - 0,891	<0,01

> **Tab. 2:** Výsledky Passing-Bablokovy regrese pro tTau, pTau a β -amyloid – srovnání 1. a 2. generace reagentií (67 vzorků)

Parametr	Průměrná diference [%]	Dolní mez	Horní mez
tTau	-2,6	-15,8	10,6
pTau	3,1	-6,2	12,3
β -amyloid	7,8	-32,2	47,7

> **Tab. 3:** Shrnutí výsledků srovnání 1. a 2. generace reagentií (Roche) ke stanovení tTau, pTau a β -amyloidu pomocí Bland-Altmanova rozdílového grafu (67 vzorků)



► Obr. 1: Srovnání 1. a 2. generace reagensů (Roche) ke stanovení tTau (a), pTau (b) a β -amyloidu (c) – Passing-Bablokova regrese (67 vzorků; výsledky v ng/l)

► Obr. 2: Grafické znázornění srovnání 1. a 2. generace reagensů (Roche) ke stanovení tTau, pTau a β -amyloidu 1-42 za použití Bland-Altmanova rozdílového grafu (67 vzorků; výsledky v ng/l)



Výsledky

Při srovnání 1. a 2. generace reagensů ke stanovení tTau, pTau a β -amyloidu na 67 vzorcích bylo dosaženo výsledků uvedených v tab. 2 a obr. 1. U stejného souboru vzorků byl dále ke srovnání použit Bland-Altmanův rozdílový graf (tab. 3). Grafické znázornění zachycuje obrázek 2.

Diskuse

Z vyhodnocení srovnání biomarkerů neurodegenerativních onemocnění Passing-Bablokovou regresí vyplynulo, že není statisticky významný rozdíl u stanovení tTau analyzovaného 1. či 2. generací reagensů, zatímco u stanovení pTau a β -amyloidu byl na hladině $P = 0,01$ statisticky významný rozdíl mezi generacemi zaznamenán. Tomu odpovídají výše uvedené výsledky: 95% interval spolehlivosti (CI) úseku na ose y pro β -amyloid nezahrnuje 0 a 95% interval spolehlivosti směrnice přímkou pro β -amyloid a pTau nezahrnuje 1.

Z Bland-Altmanova rozdílového grafu (obr. 2) je patrné, že mezi srovnávanými soubory je malý systematický posun u parametrů tTau a pTau – průměrná diference 12,61 %

a 3,1 %. Významnější posun je u β -amyloidu – průměrná diference 7,8 %. Reagenzie 2. generace poskytovaly výsledky vyšší u tTau, zatímco průměrně nižší hodnoty byly u pTau a β -amyloidu, kde se projevil jak vliv nových reagensů, tak i restandardizace. Při hodnocení velikosti maximálních odchylek zjištěných pomocí Bland-Altmanova rozdílového grafu se většinou využívá srovnání s biologickou intraindividuální variabilitou uvedenou v databázi dle Westgarda⁷ nebo v databázi EFLM (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine). Námí sledované biomarkery, nové v oblasti IVD, však v těchto databázích dosud nejsou zařazeny. Vypočítanou průměrnou diferencí lze pro imunoanalytické metody hodnotit jako obvyklou a z klinického pohledu vyhovující.

Reagenzie 2. generace jsou stejně jako předchozí generace stabilní, interní kontrola kvality vychází dlouhodobě v požadovaném rozmezí, bez nutnosti časté recalibrace. Nevýhodou zůstává, že stanovení tTau, pTau a β -amyloidu danou metodikou je nutno provádět pouze z likvoru a vyžaduje tedy invazivní odběr s využitím lumbální punkce. Závěrem lze konstatovat, že výsledky získané reagenziemi pro stanovení beta amyloidu

(1-42), tau proteinu celkového a tau proteinu fosforylovaného obou generací jsou z klinického hlediska dobře porovnatelné. Pokud laboratoř původně využívala 1. generaci, může plynule navázat měření vzorků reagenziemi 2. generace a využít tak její výhody.



RNDr. Miroslava Beňovská, Ph.D.
Ústav laboratorní medicíny – Oddělení klinické biochemie FN Brno
Kontakt: miroslava.benovska@fnbrno.cz
V Ústavu laboratorní medicíny FN Brno pracuje jako primářka OKB. Dlouhodobě se zabývá analytickou i perianalytickou automatizací, ale také zaváděním nových progresivních parametrů do klinické praxe. Od r. 2005 je zástupkyní vedoucího/přednosty Katedry laboratorních metod Lékařské fakulty MU, kde působí jako odborný asistent.



Reagenční souprava **Elecsys® Phospho-Tau (181P) CSF** je diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*. Test slouží ke kvantitativnímu měření fosforylovaného tau proteinu v lidském CSF. Spolu se stanovením Elecsys β -Amyloid (1-42) CSF II se používá na zjištění poměru jejich koncentrací u dospělých jedinců s kognitivní poruchou, u nichž se zvažuje diagnóza Alzheimerovy choroby a jiné příčiny kognitivní poruchy. Rozsah měření: 8–120 pg/ml.

Reagenční souprava **Elecsys® β -Amyloid (1-42) CSF II** je diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*. Test je určen pro imunochemické kvantitativní stanovení koncentrace β -amyloidového (1-42) proteinu v lidském mozkomíšním moku (CSF). Rozsah měření: 150–2500 pg/ml.

Reagenční souprava **Elecsys® Total-Tau CSF** je diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*. Test je určen pro kvantitativní měření celkového tau proteinu v lidském CSF. Rozsah měření: 80–1300 pg/ml.

Elektrochemiluminiscenční imunostanovení „ECLIA“ se používá na analyzátoch **cobas e**. Sendvičový princip. Určeno k použití odborníky ve zdravotnictví.

Literatura

1. Elecsys β -Amyloid (1-42) CSF II, Elecsys Total-Tau CSF, Elecsys Phospho-Tau (181P) CSF. Příbalové letáky Roche.
2. Pérez-Ruiz E, Decrop D, Ven K, Tripod L, Leirs K, Rosseels J, et al. Digital ELISA for the quantification of attomolar concentrations of Alzheimer's disease biomarker protein Tau in biological samples. *Anal Chim Acta*, 1015, 2018, 74-81.
3. Reijn TSM, Rikkert MO, Geel WJA, Jong D, Verbeek MM. Diagnostic Accuracy of ELISA and xMAP Technology for Analysis of Amyloid β_{42} and Tau Proteins. *Clin Chem*, 53, 5, 2007, 859-865.
4. Hansson O, Rutz S, Zetterberg H, Bauer E, Hahl T, Manuilova E, et al. Pre-analytical protocol for measuring Alzheimer's disease biomarkers in fresh CSF. *Alzheimer's & Dementia DADM*. 2020, 12, 1.
5. Blennow K, Zetterberg H, Rutz S, Manuilova E, Logan Ch, et al. Analytical characteristics of the updated elecsys Abeta42 Gen 2 assay, including comparisons with the Gen 1 assay. *The journal of the Alzheimer's & Dementia*. 2020, 16, 3.
6. Hansson O, Stomrud E, Zetterberg H, Rutz S, Manuilova E, Logan Ch, et al. Improved performance of Elecsys CSF Abeta measurement achieved using the simple, unified routine-use protocol for CSF collection. *The journal of the Alzheimer's & Dementia*. 2020, 16, 3.
7. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M. Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999, 59, 491-500.

Mgr. Alice Hoffmannová, Ph.D.,
MUDr. Luboš Bouček, MUDr. Jana Tůmová
FN Brno, ÚLM-OKB

Přehled využití biomarkeru S-100B v klinické praxi

Rodina proteinů S-100 je tvořena skupinou přibližně 20 bílkovin s molekulovou hmotností mezi 10–12 kDa, které se vyznačují vazbou vápenatých iontů.¹ Tyto proteiny lze lokalizovat imunohistochemickými metodami (např. za použití protilátky polyclonal rabbit anti-S-100) zejména v jádře a cytoplasmě u rozmanité skupiny buněk, jakými jsou např. Schwannovy buňky, melanocyty, gliové buňky, chondrocyty, adipocyty, makrofágy, Langerhansovy buňky, dendritické buňky či keratinocyty.² Jejich funkce spočívá především v regulaci buněčného cyklu a procesu diferenciaci.³

Proteiny S-100 fungují převážně ve formě homodimerů, v některých případech též heterodimerů, tvořených s ostatními členy S-100 rodiny (např. S-100B a S-100A6). Vazba vápníku indukuje konformační změny v proteinech S-100, které vedou k expozici hydrofobního místa schopného rozpoznat a vázat potenciální cílové struktury.¹ S-100B je izomerem S-100, který je exprimován v nejrůznějších buňkách a zastává řadu úloh v lokálních regulačních procesech zahrnujících také buněčné dělení, proliferaci, apoptózu, energetický metabolismus či zánětlivou odpověď.⁴ Mnoho proteinů z této rodiny hraje roli v prognóze a progresi onkologických onemocnění, přičemž některé z nich byly dokonce navrženy jako biomarkery pro určité typy rakovinného bujení.¹ Konkrétně u cholangiokarcinomu a rakoviny slinivky břišní byla exprese proteinů S-100A2, S-100A4, S-100A6 či S-100P zvýšena v nádorových buňkách. Tato skutečnost z nich činí potenciální diagnostické a prognostické biomarkery.³

Protein S-100B byl poprvé popsán v roce 1965 ve snaze identifikovat marker, který by dokázal reflektovat poškození mozkové tkáně. Byly provedeny mnohé studie, ve kterých se podařilo potvrdit patologické zvýšení koncentrace tohoto proteinu u osob po prodělaném traumatu hlavy. Z výsledků výzkumů vyplynulo, že zvýšená hladina



S-100B má schopnost predikovat nepříznivý klinický vývoj u těchto pacientů a mohlo by se jednat o vhodný marker odrážející poškození na úrovni mozkové tkáně.⁵ Možnost použít časný indikátor neuronálního poškození může sehrát roli při určení doby trvání a stupně mozkového poškození. Mimo to může přispět ke stanovení prognózy. Jak již bylo zmíněno výše, z klinické praxe bylo vypořazováno, že vzrůst koncentrace proteinu S-100B v krvi souvisí s akutním poškozením mozku, taktéž byla nalezena souvislost

mezi vysokými sérovými hladinami S-100B a fokální epilepsií se zvýšenou záchvatovou aktivitou. Z tohoto důvodu bylo doporučeno tento protein využívat také u pediatrických pacientů jako vhodný periferní biomarker určující poškození mozku.⁷ Zvýšená hladina S-100B byla zaznamenána i u kardiopulmonálních bypassů či srdeční zástavy.⁶

V úvahu byl brán fakt, že i poranění tkáně či fraktury by mohly stát za zvýšenými hodnotami S-100B. Z nedávno publikovaných