

Senta Frol¹, Martin Hren²

Izbira primernih monoklonskih protiteles in optimizacija imunohistokemijske metode za dokazovanje patološkega prionskega proteina v možganih bolnikov s sporadično obliko Creutzfeldt-Jakobove bolezni³

Selection of Suitable Monoclonal Antibodies and Optimization of the Immunohistochemical Method for the Detection of Pathological Prion Protein in the Brains of Patients with Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: Creutzfeldt-Jakobova bolezen – diagnostika, prioni – analiza, protitelesa monoklonska

Diagnostika prionskih bolezni temelji na imunohistokemijskem določanju ob uporabi protiteles proti prionskemu proteinu (PrP), ki ne razlikujejo med celično obliko PrP (PrP^C) in patološko izoobliko (PrP^{Sc}). Zato zahteva ta metoda močne predobdelave za odstranjevanje PrP^C in razkrivanje epitopa na PrP^{Sc} v parafinskih rezinah umrlih za prionsko boleznijo.

Namen naše naloge je bil testirati monoklonska protitelesa proti PrP^{Sc} (MPt) V5B2, K4B3, A4/5 in E5/9, ki so jih pripravili na Zavodu RS za transfuzijo krvi, jih primerjati s kontrolnimi, komercialno dostopnimi MPt 3F4 in 6H4, ter poiskati enostavnejšo predobdelavo za razkrivanje epitopa na PrP^{Sc}.

Parafinske histološke rezine vzorcev možgan štirih umrlih za sporadično Creutzfeldt-Jakobovo boleznijo (sCJB) in dveh umrlih primerljive starosti, ki nista imela CJB, smo obdelali s prilagojeno standardno imunohistokemijsko metodo avidin-biotin kompleks (ABC) ob uporabi naših MPt, kontrolnih MPt in štirih predobdelav. Imunohistokemijsko reakcijo (IHR) z našimi MPt in PrP^{Sc} smo primerjali z IHR med kontrolnima MPt (3F4 in 6H4) in PrP^{Sc} z ozirom na jakost signala IHR in število pozitivnih reakcij. Ista MPt smo uporabili tudi na zaledenelih rezinah vzorcev dveh ne-CJB-možgan brez kakršnekoli predobdelave.

V nalogi smo pokazali, da so vsa štiri testirana MPt specifična za PrP^{Sc}, saj za razliko od dveh kontrolnih MPt niso prikazala PrP^C v zaledenelih rezinah svežih ne-CJB-možgan. Prav tako smo pokazali, da se z močnejšimi predobdelavami histoloških rezin IHR izboljša, tako v jakosti kot tudi v številu pozitivnih reakcij ($p < 0,05$). Naše MPt V5B2 je občutljivejše od kontrolnega MPt 3F4 ($p = 0,03$) in je zmožno z manj intenzivno predobdelavo zanesljivo označiti PrP^{Sc} v možganih obolelih za CJB.

Z omenjenimi rezultati smo dokazali specifičnost vseh naših MPt za PrP^{Sc}. Pokazali smo, da se ta MPt med seboj razlikujejo po občutljivosti in da je za diagnostiko sCJB najbolj primerno MPt V5B2, primernejše tudi od dveh kontrolnih MPt. Domnevamo, da je MPt V5B2 primerno za izdelavo testov za dokazovanje PrP^{Sc} v zaledenelih rezinah potencialno okuženih tkiv ali pa v telesnih tekočinah.

¹ Senta Frol, štud. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

² Martin Hren, štud. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.

³ Delo je bilo nagrajeno s Prešernovim priznanjem za študente za leto 2001.

ABSTRACT**KEY WORDS:** Creutzfeldt-Jakob syndrome – diagnosis, prions – analysis, antibodies monoclonal

Reliable diagnosis of prion diseases is based on a positive immunohistochemical reaction (IHR) using antibodies against prion protein (PrP). Unfortunately, this does not distinguish between cellular PrP (PrP^C) and the pathological isoform (PrP^{Sc}). Consequently, this method requires intensive pre-treatments to remove PrP^C and retrieve the epitope of PrP^{Sc} in paraffin sections of the brains of patients with prion disease.

The aim of this study was to test anti-PrP monoclonal antibodies (MAb) V5B2, K4B3, A4/5 and E5/9, which were prepared at the Blood Transfusion Center of Slovenia, in order to compare them with commercially available MAb 3F4 and 6H4, and to design a simple antigen retrieval method to label PrP^{Sc} in immunohistochemistry.

Sections of paraffin-embedded brain tissue for four cases of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) and of two deceased patients of similar age who had not had CJD were treated with a modified standard ABC immunohistochemical method using our MAb, control MAb and four pre-treatments. The IHR of our MAb was compared with the IHR of the control MAb (3F4 and 6H4) with regard to the intensity of IHR and the number of positive reactions. The same MAb were tested on the frozen sections of two brains not affected by CJD without any pre-treatment.

The results showed that all four tested MAbs were specific for PrP^{Sc} since, unlike the two control MAbs, they did not react with PrP^C in the frozen sections of non-CJD brain. An improvement in IHR at more intense section pre-treatments of tissues was also demonstrated in terms of intensity and the number of positive reactions ($p < 0.05$). Our MAb V5B2 is more sensitive than the control MAb 3F4 ($p = 0.03$). It does not need an equally intense pre-treatment as MAb 3F4 to label PrP^{Sc} in CJD-affected brain.

The obtained results confirmed the hypothesis on the specificity of our MAb for PrP^{Sc}. Furthermore, we found that MAbs differ in terms of sensitivity and that MAb V5B2 is best suited for the diagnosis of CJD, even more so than the two control MAbs. MAb V5B2 is assumed to be suitable for the development of tests capable of detecting native PrP^{Sc} in frozen sections of potentially infected tissues, or in the bodily fluids of patients with prion diseases.

UVOD**Prion**

Danes velja, da prionske bolezni povzročajo prioni. Prion je po hipotezi Stanleyja B. Prusinerja definiran kot beljakovinski kužni delec, brez nukleinske kisline (1, 2). Sama zamisel je v začetku povzročila mnogo dvomov – nekateri so mrzlično iskali sledove kakršnekoli nukleinske kisline, da bi dokazali obstoj neke vrste počasnega virusa. Dandanes je eksperimentalnih dokazov preprosto preveč, da bi se jim dalo oporekati, poglavje o prionskih boleznih pa nas je s svojo svojstvenostjo naučilo tudi strpnosti do idej, ki se v začetku zdijo nesprejemljive. Prusiner je

leta 1997 za prionsko hipotezo prejel Nobelovo nagrado za medicino (1–3).

Prion (PrP^{Sc}) je patološka izoforma prionskega glikoproteina, ki je v svoji fiziološki obliki normalno prisoten na celični membrani različnih celic, vendar je najmočnejše izražen v možganih. S poskusi na miškah je dokazano, da je njegova prisotnost nujno potrebna za razvoj prionskih bolezni (2).

PrP^C in PrP^{Sc} se ne razlikujeta v aminokislinskem zaporedju, razlikujeta pa se po svoji terciarni strukturi. Približno 40% molekule PrP^C ima obliko α -vijačnice, zelo majhen del je v obliki β -nagubanega lista, medtem ko je v PrP^{Sc} le približno 30% molekule v obliki α -vijačnice in kar 45% v obliki β -nagubanega lista (2).

Kužnost prionov je neuničljiva z običajnimi metodami, ki sicer uničijo vse ostale povzročitelje kužnih bolezni (formalin, X-žarki, UV-žarki, običajno avtoklaviranje, nukleaze) (4). Njihova odpornost je tudi razlog za nastanek iatrogenih oblik prionskih bolezni, kjer prihaja do prenosa prionov z običajno steriliziranimi kirurškimi instrumenti in stereotaktičnimi elektrodami ter s kadavrskimi tkivi.

Prionske bolezni

Prionske bolezni so edinstvene zaradi njihove pojavnosti v različnih oblikah, tako patogenetskih kot tudi kliničnih in histopatoloških. To so namreč edine, do tega trenutka znane bolezni, ki se pojavljajo v sporadični, dedni in kužni obliki, vsaka s svojimi posebnostmi, vendar z enakim etiološkim dejavnikom. Prav tako so dedne prionske bolezni edine dedne bolezni, ki so lahko prenosne oz. kužne.

Prionske bolezni, ki so jih opisali pri ljudeh: Creutzfeldt-Jakobova bolezen (CJB), usodna družinska nespečnost (FFI – fatalna familiarna insomnia), Gerstmann-Sträussler-Scheinkerjev sindrom (GSS), kuru (4, 5), nova različica CJB (vCJB) (6). Pri živalih so najbolj proučene prionske bolezni: praskavec, BSE (1, 4) itn. Številni posredni dokazi kažejo, da naj bi prišlo do prenosa govejih prionov na človeka (6–9).

Diagnostika prionskih bolezni – pomen imunohistokemije

Zaradi narave prionskih bolezni in njihovega povzročitelja je njihova natančna diagnostika tako pri človeku kot tudi pri živalih neizmerne pomena. Najpomembnejše je namreč preprečevanje prenosa prionov s človeka na človeka (možnost iatrogene oblike CJB) in z goveda na človeka (vCJB). Dodaten problem pri preprečevanju prenosa je dolga inkubacijska doba teh bolezni, v kateri je možen prenos bolezni, preden se pojavijo klinični znaki. Patohistološke spremembe v možganih so nespecifične, torej na podlagi le-teh ni možna zanesljiva diagnoza prionskih bolezni (10).

Zadnje desetletje je metoda izbire za potrditev klinične diagnoze prionskih bolez-

ni imunohistokemija, to je prepoznavanje antigenov v tkivnih rezinah s pomočjo specifičnih protiteles. Metoda se uporablja na histoloških rezinah vzorcev možgan umrlih za prionskimi boleznimi in je visoko specifična (10–12).

Pri imunohistokemijski metodi pa se srečujemo predvsem z dvema težavama. Prva je zakritje epitopov na molekuli priona po fiksaciji možgan v formalinu (13). Zato je treba razkriti vezno mesto za protitelo, kar je klasični korak pri imunohistokemijski obdelavi kateregakoli tkiva, ki je bilo dlje časa fiksirano. Druga težava je dejstvo, da do današnjega dne še niso opisali protitelesa, ki bi bilo specifično za PrP^{Sc} in ne bi hkrati označilo tudi v možganih prisotnega PrP^C. Da bi obšli obe težavi, so raziskovalci preizkušali razne načine predobdelave tkiva (10, 12–14). Pri tem so izkoristili odpornost prionov na delovanje proteoliznih encimov, s katerimi so najprej uničili PrP^C, da so nato lahko prikazali samo preostali PrP^{Sc} tudi z nespecifičnimi protitelesi. Multicentrična študija, ki je bila opravljena leta 1997 v Veliki Britaniji, narekuje uporabo avtoklaviranja (10 minut pri 121 °C), mravljične kisline (5 minut, 96 % HCOOH) in 4M-gvanidijevga tiocianata (2 uri pri 4 °C) kot najboljšo kombinacijo predobdelav, ki reši obe težavi, s katerimi se srečujemo pri dokazovanju prionov z imunohistokemijsko metodo (14).

S protitelesi, specifičnimi za PrP^{Sc}, bi se izognili zamudnim in zahtevnim predobdelavam, ki večkrat uničijo histološko rezino. Takšna protitelesa bi lahko uporabili tudi za razvoj metod, ki bi predstavljale hitrejšo, enostavnejšo in zato tudi cenejšo diagnostiko BSE v klavnica.

NAMEN RAZISKAVE

Na Zavodu RS za transfuzijo krvi v Ljubljani so z imunizacijo miši BALB/c s 13-aminokislinskim peptidom, izbranim iz primarne strukture humanega PrP, ki je bil vezan na nosilno molekulo, dobili izredno dober imunski odziv. Izolirali so paleta MPt-s (15–17), ki so jih nato testirali tudi s pomočjo IHR na parafinskih histoloških rezinah vzorcev možgan dvanajstih bolnikov, ki so v Sloveniji umrli zaradi sporadične oblike CJB (sCJB) v obdobju od leta 1988 do leta 2001, in na

enakem številu ne-CJB-možganov primerljive starosti. Štiri MPt-a z oznakami V5B2, K4B3, A3/4 in E9/5, ki so označile le PrP^{Sc} v CJB-možganih in nobene strukture v ne-CJB-možganih, smo izbrali z namenom, da dokažemo njihovo specifičnost za PrP^{Sc} z imunohistokemijsko metodo ter da standardiziramo enostavno imunohistokemijsko metodo za dokazovanje prionov s temi MPt. Ta metoda bo omogočila zanesljivo diagnostiko prionskih bolezn.

MATERIAL IN METODE

Imunohistokemijska reakcija na parafinskih rezinah sCJB-in ne-CJB-možgan

Izbrana MPt-a smo testirali in standardizirali na parafinskih rezinah vzorcev velikih in malih možgan štirih bolnikov, ki so umrli za sCJB. Za kontrolo smo uporabili vzorce možgan dveh umrlih primerljive starosti, ki niso vsebovali prionov. IHR naših MPt-s smo primerjali z dvema komercialno dostopnima MPt, 3F4 (Senetek, ZDA) in 6H4 (Prionics, Švica), ki ne razlikujeta med PrP^C in PrP^{Sc}.

Po štirinajstdnevni fiksaciji v 10% formalinu smo po en vzorec iz malih in velikih možganov eno uro razkuževali v 96% mravljični kislini (18). Na ta način smo preprečili vnos prionov v laboratorij in morebitno okužbo tehničnih delavcev. Po tridesetminutnem izpiranju v tekoči vodi smo vzorce dehidrirali v naraščajočih koncentracijah etanola (70%, 95% in 100%) in ksilolu ter jih vklopili v parafin. Z mikrotomom smo odrezali 10 μ debele histološke rezine in jih postavili na adhezivna predmetna stekelca firme Menzel. Sledilo je sušenje histoloških rezin v termostatu na 59°C čez noč. Ohlajene rezine smo deparafinirali v treh izmenjavah ksilola po 5 minut, nato smo jih rehidrirali po 3 minute v pada-

jočih koncentracijah etanola (100%, 95% in 70%) in sprali v destilirani vodi. Pred uporabo primarnih protiteles smo histološke rezine razdelili v štiri skupine in jih obdelali na štiri načine (angl. *pre-treatment* – PT), z namenom razkriti epitope na PrP^{Sc} in uničiti PrP^C (tabela 1).

Nadaljnji postopek je potekal avtomatično v stroju Ventana Nexes firme Ventana iz ZDA, ki uporablja avidin-biotin kompleks imunohistokemijsko metodo.

Prvi korak v stroju je 4-minutna blokada endogene peroksidaze s peroksidom, ki je razredčen v pufri. Primarna MPt smo uporabili v obliki supernatanta v koncentraciji 1–2 μ g/ml. Komercialni protitelesi, 3F4 in 6H4, smo uporabili v enaki koncentraciji. Inkubacija primarnih MPt na histoloških rezinah je trajala 20 minut pri temperaturi 38°C, ki je delovna temperatura za celotno IHR. Nato je sledila inkubacija s komercialnimi biotiniziranimi sekundarnimi kozjimi protitelesi proti mišjim imunoglobulinom 8 minut. Tako povečano molekulo smo označili z avidinom, ki se je vezal na biotin 8 minut. Komercialno pripravljena raztopina peroksidaze se je v osmih minutah vezala na avidin. Mesto vezave primarnega MPt-a smo pokazali s 3,3-diaminobezidinom (DAB), ki se je oboril kot rjavo barvilo. Obarjanje DAB-a je omogočila reakcija med peroksidazo, ki je vezana na avidin, in peroksidom, ki ga je stroj nakapal na histološko rezino neposredno pred DAB. Stroj je med posameznimi fazami dela histološke rezine močno izpiral s pufri, tako da so bila vsa protitelesa, ki se niso vezala, odstranjena. Vsi reagenti, razen protiteles proti PrP, ki so vključeni v sistem avtomatične IHR, so izdelki firme Ventana. Njihova natančna sestava nam ni znana.

Za kontrolo samega postopka IHR smo pri seriji rezin iz vseh testiranih vzorcev možgan izpustili primarno MPt.

Tabela 1. Tkivne predobdelave, ki smo jih uporabili na parafinskih rezinah malih in velikih možgan bolnikov s sporadično CJB.

PT I	– brez kakršnekoli predobdelave
PT II	– 5 minut v 96% mravljični kislini
PT III	– 10 minut v mikrovalovni pečici v EDTA-pufri (temperatura 97°C, pH=8), sledi 15 minut hlajenja na sobni temperaturi, zatem še 5 minut v 96% mravljični kislini na sobni temperaturi
PT IV	– 30 minut avtoklaviranja v malem avtoklavu v citratnem pufri pH=7,3 na temperaturi 121°C, zatem hlajenje 5 minut v hladni destilirani vodi, potem še 5 minut v 96% mravljični kislini

Zaradi lažjega ocenjevanja lokalizacije IHR smo jedra v histoloških rezinah kontrastirali 4 minute z Mayerjevim hematoksilinom.

Nato smo histološke rezine pokrili s krovni- mi stekelci v stroju RCM (angl. *robot coverslipping machine*) 2000 tovarne Medite-Meisai, Japonska.

Imunohistokemijska reakcija v za- ledenelih rezinah ne-CJB-možgan

Na zaledenelih rezinah malih možganov dveh umrlih, ki nista imela CJB, smo izved- li imunohistokemijsko reakcijo z istimi MPt-i (V5B2, K4B3, A3/4, E9/5, 3F4 in 6H4) brez uporabe kakršnekoli predobdelave.

Sveže vzorce malih možgan smo postavili na kovinske podloške, pokrite s krioprotektiv- nim medijem, ki ščiti tkivo pred poškodbo pri zmrzovanju. Pet minut smo jih zamrzovali v kriostatu na temperaturi -25°C . Nato smo, prav tako v kriostatu, rezali $10\ \mu$ debele rezi- ne, jih postavili na predmetna stekelca, ki so tovarniško prevlečena z adhezivno snovjo. Po sušenju na zraku eno uro smo jih inkubirali v normalnem konjskem serumu. Sledila je inkubacija s primarnimi MPt v koncentraci- ji $1-2\ \mu\text{g/ml}$, dve uri na sobni temperaturi. Biotinilirano konjsko sekundarno protitelo proti mišjim imunoglobulinom (Vector Labo- ratories, ZDA) smo razredčili $1:1500$ in ga nanесли na histološke rezine za 90 minut, nato je sledilo 60 minut inkubacije histoloških rezin z avidin-biotin-peroksidaznim kom- plesom (ABC Elite Standard Kit, Vector Laboratories, ZDA). IHR smo vizualizirali z DAB v prisotnosti H_2O_2 . Po večkratnem izpi- ranju smo kontrastirali jedra z Mayerjevim hematoksilinom. Histološke rezine smo trajno pokrili z DePeX (Chema, Nemčija) in krovni- mi stekelci.

REZULTATI

IHR med anti-PrP^{Sc} MPt in PrP^{Sc} na parafinskih histoloških rezinah vzorcev iz štirih CJB- in dveh ne-CJB-možgan

Nobeno od naših MPt-s ni reagiralo s PrP^C, ne glede na predobdelavo. Tudi komercialni MP, 3F4 in 6H4, nista kazali imunoreaktivnosti s PrP^C pod enakimi pogoji. Imunoreaktivnost vseh MPt s PrP^{Sc} je naraščala od PT I do PT

IV. Jakost IHR pri MPt V5B2 in K4B3 je močnejša že pri šibkejših PT (PT I in II) v pri- merjavi s MPt A3/4, E9/5, 3F4 in 6H4. MPt V5B2 in K4B3 sta najmočnejše označila PrP^{Sc} ob uporabi PT III, kar je zadosten signal za diagnozo CJB. Komercialno MPt 3F4, ki sicer ni označilo PrP^{Sc} ob uporabi dveh šibkejših PT I in II in je ob uporabi PT III označilo le žariščno PrP^{Sc}, je ob uporabi najmočnejšega PT IV označilo PrP^{Sc} nekoliko močnejše kot V5B2 in K4B3 (tabela 2, slika 1). Pomanjklji- vost te predobdelave je, da hudo okvari histološke rezine zaradi daljšega kuhanja le-teh.

Tabela 2. Jakost imunohistokemijske reakcije med posamez- nimi protitelesi in PrP^{Sc} v histoloških preparatih možgan 4 bolnikov, umrlih za sCJB. Podani so razponi ocen jakosti IHR, ugotovljeni na možganskih rezinah 4 primerov CJB.

	PrP ^{Sc}			
	PT I	PT II	PT III	PT IV
V5B2	0-1	1	1-2	1-3
K4B3	0-1	1	1-2	1-3
A3/4	0-1	0-1	0-1	1-2
E9/5	0	0-1	0-1	1-2
3F4	0	0	0-1	2-3
6H4	0-1	0-1	0-2	2

Legenda: 0 – brez vidne IHR; 1 – blaga IHR; 2 – zmerna IHR; 3 – močna IHR; PT I-IV, različne predobdelave rezin (glej tabela 1).

Nobeno MPt ne označi PrP^{Sc} po PT I (a, č, f). Po PT III V5B2 najboljše označi PrP^{Sc} (b) v primerjavi s 3F4 (d) in 6H4 (g). PT IV najbolj pojača IHR med V5B2 in PrP^{Sc} (c), nekoliko manj, vendar tudi med 3F4 in PrP^{Sc} (e), medtem ko ta predobdelava ne vpliva bis- tveno na IHR med 6H4 in PrP^{Sc} (h). PT IV močno poškoduje histološke rezine (c, e, h).

Merilo na sliki h predstavlja $30\ \mu$ za sli- ke a, b, č, d, f, g, in $60\ \mu$ za slike c, e, h.

Na histoloških rezinah vzorca velikih možgan umrlega, ki ni imel kliničnih znakov okvare osrednjega živčevja in v katerih mikroskopski pregled ni pokazal nobenih spre- memb, ter vzorca velikih možgan umrlega, ki je imel Alzheimerjevo bolezen (negativna kontrola), ki smo jih testirali pod enakimi pogoji in z enakimi MPt-i, nismo opazili vzorca IHR, ki bi bil značilen za katerikoli

V5B2

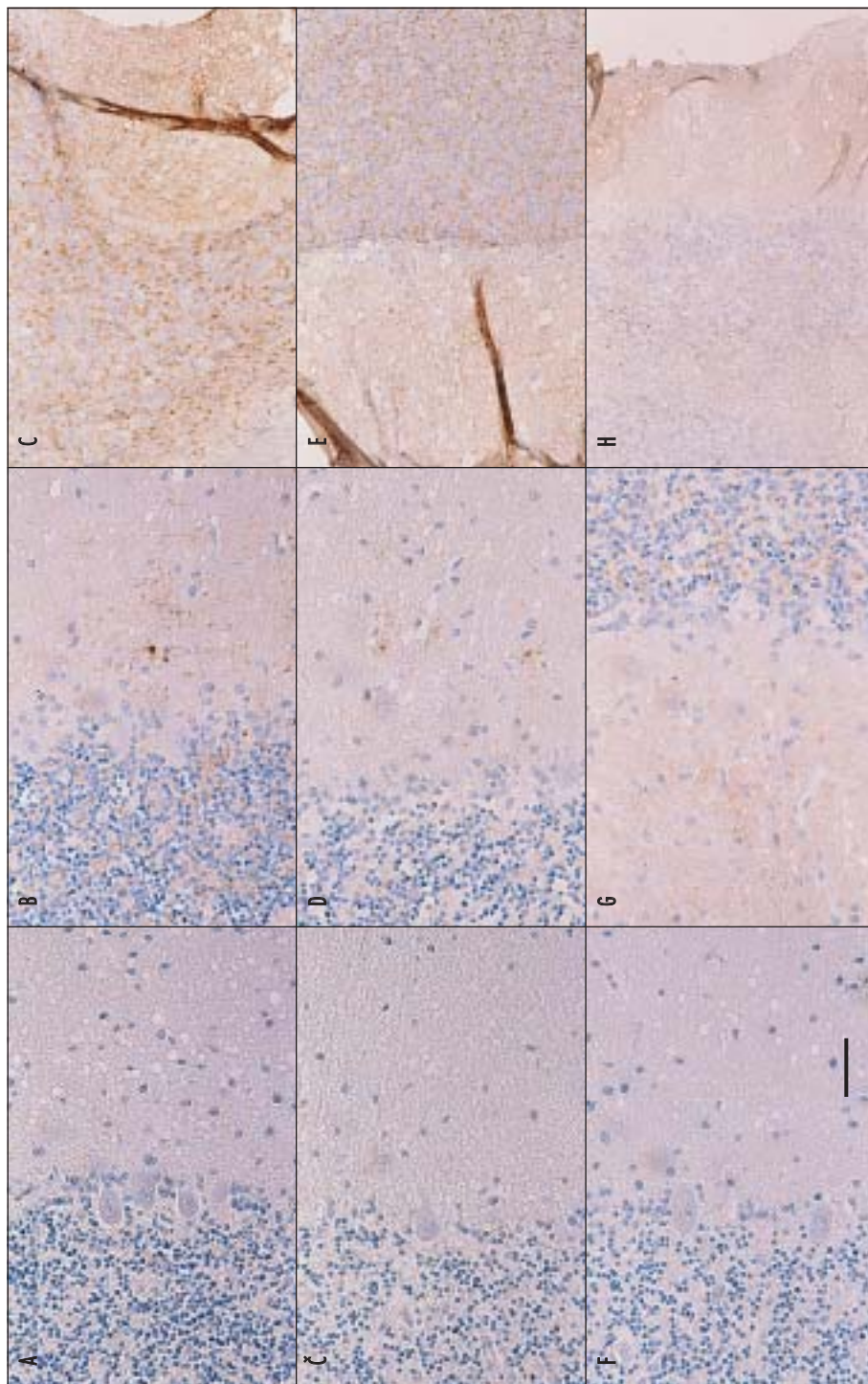
3F4

6H4

PT IV

PT III

PT I



Slika 1. Prikaz jakosti IHR z V5B2, 3F4 in 6H4 po PT I, PT III in PT IV v histoloških rezinah malih možgan s sinaptičnim vzorcem odlaganja PrP^{Sc}.

način odlaganja PrP^{Sc}, prav tako pa ni bilo nikjer opaziti IHR na PrP^C.

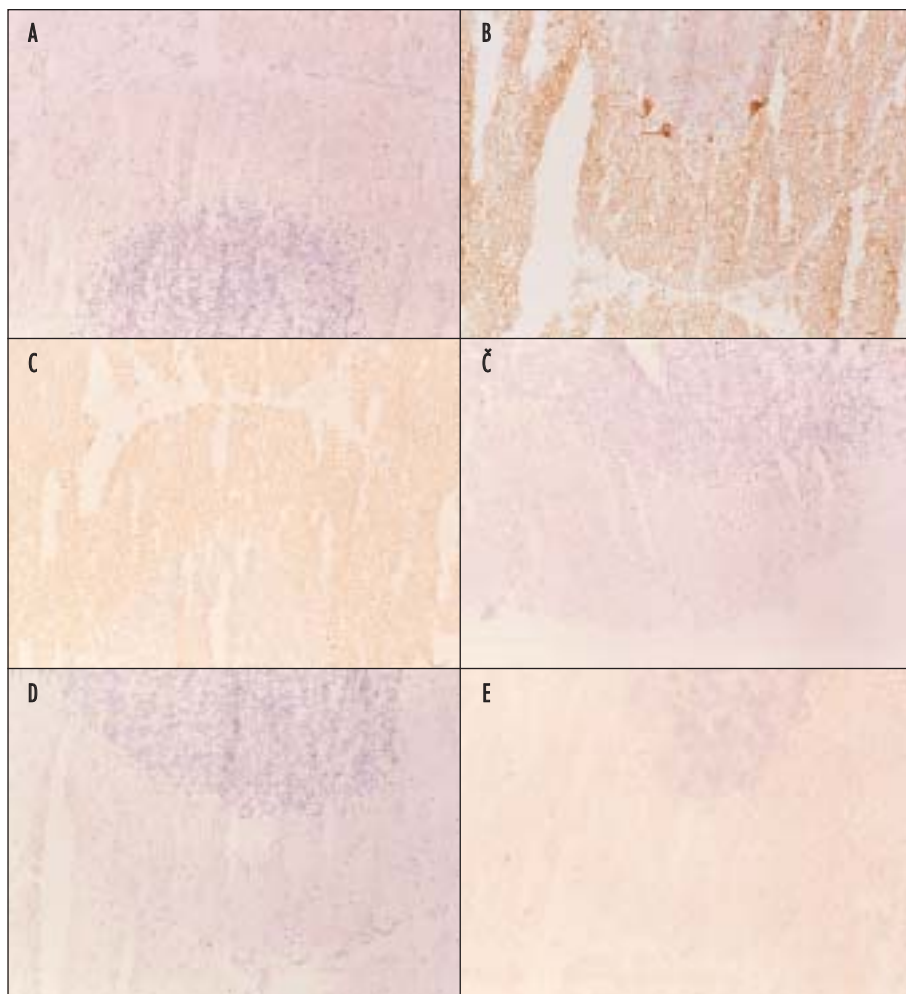
Kontrola imunohistokemijske metode, ki smo jo opravili na vseh testiranih vzorcih tako, da smo iz postopka izpustili primarno monoklonsko protitelo, je pokazala, da se nobena druga kemikalija v postopku IHR ni vezala na histološke rezine.

IHR med anti-PrP^{Sc} MPt in PrP^C na zaledenelih histoloških rezinah ne-CJB-možgan

Nobeno od štirih MPt, pripravljenih na ZTK, ni v zaledenelih rezinah ne-CJB-možgan pri-

kazalo PrP^C, medtem ko sta obe komercialni MPt (3F4 in 6H4) označili PrP^C (slika 2). Zaradi prevelikega tveganja za okužbo nismo opravili pregleda zaledenelih rezin svežih CJB-možgan. Jakost IHR med 3F4 in PrP^C je bila zmerna v nevrotilu skorje malih možgan in močna v Purkinjevih celicah, medtem ko MPt 6H4 ni označilo PrP^C v Purkinjevih celicah, ampak je le blago označilo PrP^C v nevrotilu skorje malih možgan (slika 2).

(a) V5B2 ne označi nobene strukture v zaledeneli rezini skorje malih ne-CJB-možgan, kot tudi ne K4B3 (d) in A3/4 (e). Imunoreaktivnost s temi MPt je popolnoma enaka



Slika 2. Prikaz IHR v V5B2, 3F4 in 6H4 na zaledenelih rezinah ne-CJB možgan, v katerih je PrP^C.

imunoreaktivnosti v histološki rezini na sliki b, ko smo iz imunohistokemijske reakcije izpustili primarno protitelo (-K). (c) 3F4 je močno reagiral s PrP^C v Purkinjevih celicah (puščica) in za spoznanje šibkeje s PrP^C v ostalih strukturah skorje malih možgan. (č) Reakcija med 6H4 in PrP^C v zaledeneli rezini malih možgan je le blago pozitivna. To MPt ne označi Purkinjevih celic.

Merilo na sliki e predstavlja 120 μ in velja za vse slike.

S pomočjo t-parjenja smo izračunali t-vrednosti primerjave jakosti IHR pri uporabi MPt V5B2 in 3F4 (tabela 3). Na podlagi teh rezultatov smo lahko podali relativno oceno kvalitete obeh MPt-s pri uporabi v imunohistokemiji. Ugotovili smo, da je MPt V5B2 boljše (bolj občutljivo) kakor kontrolno MPt 3F4 ($p=0,03$). To lahko trdimo s 97 % zanesljivostjo.

Tabela 3. Povprečne vrednosti IHR (rezultati vseh PT) za MPt 3F4 in MPt V5B2 ter korelacija med obema rezultatoma. SD – standardna deviacija; povprečna jakost IHR od 0 do 3.

MPt	3F4	V5B2
Povprečna jakost IHR	0,8125	1,4375
Napaka SD	0,5896	0,2772
Korelacija med MPt V5B2/3F4		
$t = -2,24$		
$p = 0,03$		
$1 - p = 0,97$		

RAZPRAVLJANJE

Uspešna in zanesljiva diagnostika prionskih boleznij je najpomembnejše orodje za preprečevanje njihovega širjenja. Pri izpopolnjevanju tega orodja so raziskovalci v preteklih letih postavili na prvo mesto imunohistokemijo, ki ima zaradi nespecifičnih in nestalnih patohistoloških sprememb jasne prednosti pred klasično histologijo (5, 11). Imunohistokemija je tudi potrjena diagnostična metoda (19, 20). Glavni težavi, s katerimi se v imunohistokemiji srečujemo, sta nespecifičnost dostopnih protiteles za PrP^{Sc} in zakritje epitopov na molekuli priona zaradi fiksacije tkiva v formalinu (21, 22). Priporočene predobdelave možganskega tkiva, s katerimi se izognemo obema težavam, so dokaj zapletene in zamud-

ne ter so zaradi tega neprimerne za rutinsko vsakodnevno diagnostiko. Prav tako so te predobdelave neprimerne za diagnostiko prionov v telesnih tekočinah (23, 24). V telesnih tekočinah sicer ni težav zaradi zakritja epitopa (ni fiksacije v formalinu), vendar problem predstavlja nespecifičnost MPt, saj je znano, da je PrP^C izražen tudi na eritrocitih, trombocitih, limfocitih in granulocitih (25).

S protitelesi, ki bi razlikovala med obema izooblikama PrP oz. bi bila specifična za PrP^{Sc}, bi se zapletenost imunohistokemijskih predobdelav na parafinskih rezinah možgan umrlih za CJB zmanjšala, saj bi morali samo še razkriti epitope na PrP^{Sc}, ne bi pa bilo več treba uničevati PrP^C. Taka protitelesa bi omogočila enostavno diagnostiko prionov v svežem možganskem tkivu (BSE) in v telesnih tekočinah (vCJB) brez strahu pred lažno pozitivnimi rezultati in bi omogočila izdelavo hitrih testov, ki bi poenostavili diagnostiko prionskih boleznij (24).

Upoštevajoč vsa ta dejstva, smo v naši raziskavi skušali dokazati specifičnost testiranih MPt za PrP^{Sc} tudi z imunohistokemijsko metodo in jo optimirati na takšen način, da bi bila njihova uporaba čim bolj preprosta, kljub temu pa bi dosegli enako občutljivost, kot jo imajo komercialno dostopna protitelesa z zahtevnejšimi in zamudnejšimi predobdelavami (10).

Na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo, da so vsa naša MPt specifična za PrP^{Sc}, saj niso reagirala s PrP^C v njegovi nativni obliki. Treba pa se je zavedati, da imunohistokemija ni visoko občutljiva metoda in da zaradi tega še vedno obstaja možnost vezave naših MPt na majhno število molekul PrP^C, ki je premajhno za zaznavo z IHR. To je treba ugotoviti z drugimi metodami. Prav tako moramo omeniti, da nismo imeli pogojev, da bi opravili IHR z našimi MPt-i in nativno kužnino v zaledenelih rezih CJB-možgan.

Glede na to, da na podlagi našega poskusa menimo, da sta naši MPt-i V5B2 in K4B3 specifični za PrP^{Sc} in da v parafinskih rezinah zanesljivo prikažeta odlaganje PrP^{Sc} tudi ob uporabi enostavnejše predobdelave (PT III), ki ne uničuje histoloških rezin, lahko trdimo, da sta primernejši za uporabo v diagnostiki prionskih boleznij na parafinskih rezinah od komercialnih protiteles.

ZAKLJUČKI

Rezultati raziskovalne naloge potrjujejo hipotezo, da so štiri MPt (V5B2, K4B3, A3/4 in E9/5), ki so jih pripravili na Zavodu RS za transfuzijo krvi, specifična za PrP^{Sc} v primerjavi s komercialnima MPt, 3F4 in 6H4, ki ne razlikujeta med PrP^C in PrP^{Sc}.

Menimo, da je PT III najprimernejša predobdelava za diagnostiko prionskih boleznih pri ljudeh na parafinskih histoloških rezinah, ker je enostavna, ne poškoduje histoloških rezin in omogoča zanesljivo IHR med MPt V5B2 in PrP^{Sc} v možganih umrlih za CJB. V primeru negativne reakcije ob močnem kliničnem sumu na CJB pa predlagamo uporabo PT IV, ki bo z MPt V5B2 ta sum zanesljivo potrdila ali ovrgla.

V Sloveniji izdelana MPt bi bila zaradi svoje specifičnosti idealna za izdelavo hitrih testov, ki bi omogočili hitro in zanesljivo dokazovanje prionov v možganih govedih,

organov, namenjenih transplantacijam in v tkivnih tekočinah. Treba je še dokazati, da se ta protitelesa vežejo na nativno kužnino.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se mentoricama, doc.dr. Mari Popović, dr.med. in doc.dr. Vladki Čurin - Šerbec, dipl.ing.kem., za pomoč pri izvedbi naloge, voljo pri popravljanju najinega dela in vztrajanju pri delu z nama.

Zahvalila bi se rada tudi doc.dr. Mari Bresjanac, dr.med., ki je ročno izvedla imunohistokemijo na zaledenelih rezinah. Dr. Vesni Galvani in Elviru Mujkiču se zahvaljujemo za pomoč pri izbiri ustreznih statističnih metod in svetovanju pri obdelavi zbranih podatkov. Hvala dr. Ruth Ruprecht za pomoč pri izdelavi slik. Hvala tudi Andreju Bergauerju za njegovo potrpežljivost pri urejanju in opremljanju izdelanih slik.

LITERATURA

1. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216: 136-44.
2. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 13363-83.
3. Popović M. Nobelova nagrada za medicino 1997. Stanley B. Prusiner - oče priona. *Proteus* 1998; 6 (60): 275.
4. Popović M. Prionske bolezni pri človeku. *Med Razgl* 1997; 36: 181-9.
5. Ironside JW. Prion diseases in man. *J Pathol* 1998; 186: 227-34.
6. Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside JW, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of »new variant« CJD. *Nature* 1996; 383: 685-90.
7. Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KCL, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 1997; 389: 448-50.
8. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCordle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ. Transmissions to mice indicate that »new variant« CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997; 389: 498-501.
9. Scott MR, Will R, Ironside JW, Nguyen HOB, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *PNAS* 1999; 96 (26): 15137-42.
10. Hayward PAR, Bell JE, Ironside JW. Prion protein immunocytochemistry: reliable protocols for the investigation of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 1994; 20: 375-83.
11. Bell JE, Ironside JW. Neuropathology of spongiform encephalopathies in humans. *British Medical Bulletin* 1993; 49 (4): 738-77.
12. Kitamoto T, Ogomori K, Tateishi J, Prusiner SB. Methods in laboratory investigation. Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Laboratory Investigation* 1987; 57 (2): 230-6.
13. Everbroeck BV, Pals P, Martin JJ, Cras P. Antigen retrieval in prion protein immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1999; 47 (11): 1465-70.
14. Bell JE, Gentleman SM, Ironside JW, McCordle L, Lantos PL, Doey L, Lowe J, Fergusson J, Luthert P, McQuaid S, Allen IV. Prion protein immunocytochemistry - UK five centre consensus report. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 1997; 23: 26-35.
15. Čurin Šerbec V, Hartman Pretnar K, Vranac T, Šprohar M, Popović M, Voljč B, Jung M. Site-directed monoclonal antibody specifically recognizes PrP (Sc). *Vox Sang* 78 (Suppl 1), 0057.
16. Čurin Šerbec V. Antibodies capable to selectively detect prion PrP^{Sc} isoforms. USA 09/576,724; EP 00 111 108.7 (2000).
17. Popović M. Prioni in anti-prioni. *ISIS* 2001; 40-2.

18. Herbert Budka, Adriano Aguzzi, Paul Brown, Jean-Marie Brucher, Orso Bugiani, John Collinge, Heino Diringer, et al. Tissue Handling in suspected Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol* 1995; 5: 319-22.
19. Kretzschmar HA, Ironside JW, DeArmond SJ, Tateishi J. Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeld-Jakob disease. *Arch Neurol* 1996; 53: 913-20.
20. Yokoyama T. The immunodetection of the abnormal isoform of prion protein. *Histochem J* 1999; 31: 209-12.
21. MacDonald ST, Sutherland K, Ironside JW. A quantitative and qualitative analysis of prion protein immunohistochemical staining in Creutzfeldt-Jakob disease using four anti- prion protein antibodies. *Neurodegeneration* 1996; 5: 87-94.
22. Takahashi H, Takahashi RH, Hasegawa H, Horiuchi M, Shinagawa M, Yokoyama T, Kimura K, et al. Characterization of antibodies raised against bovine-PrP-peptides. *J Neurovirol* 1999; 5: 300-7.
23. Ironside JW, Head MW, Bell JE, McCardle L, Will RG. Laboratory diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Histopathology* 2000; 37 (1): 1-9.
24. Shaked GM, Shaked Y, Kariva Z, Halimi M, Avraham I, Gabizon R. A protease resistant PrP isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J Biol Chem* 2001; 276: 31478-82.
25. Brown P. Transfusion medicine and spongiform encephalopathy. *Transfusion* 2001; 41: 433-6.

Prispelo 5. 4. 2002

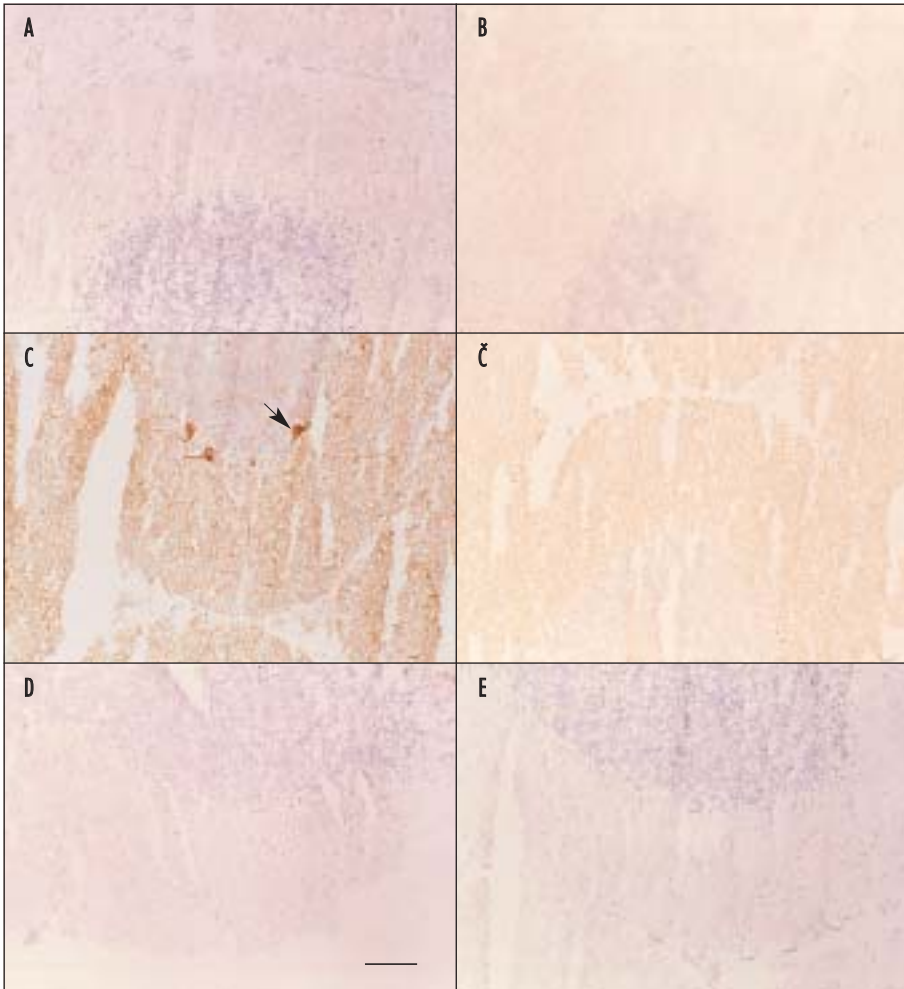
Obvestilo uredništva!

V 1. številki 41. letnika revije Medicinski razgledi je v članku avtorjev Sente Frol in Martina Hrena z naslovom Izbira primernih protiteles in optimizacija imunohistokemijske metode za dokazovanje patološkega prionskega proteina v možganih bolnikov s sporadično

obliko Creutzfeldt-Jakobove bolezni žal prišlo do zamenjave slike 2 na strani 9. Pravilno sliko s pripadajočim besedilom ponovno objavljamo.

Za zamenjavo se avtorjema in bralcem opravičujemo.

Uredništvo Medicinskih razgledov



Slika 2. Prikaz IHR z V5B2, 3F4 in 6H4 na zaledenelih rezinah ne-CJB možgan, v katerih je le PrPC.

Slika a – V5B2 ne označi nobene strukture v zaledeneli rezini skorje malih ne-CJB možgan, kot tudi ne K4B3 (slika d) in A3/4 (slika e). Imunoreaktivnost s temi MPt-i je popolnoma enaka imunoreaktivnosti v histološki rezini na sliki b, ko smo iz imunohistokemijske reakcije izpustili primarno protitelo (-K). Slika c – 3F4 je močno reagiral s PrPC v Purkinjevih celicah (puščica) in za spoznanje šibkeje s PrPC v ostalih strukturah skorje malih možgan. Slika c – Reakcija med 6H4 in PrPC v zaledeneli rezini malih možgan je le blago pozitivna. Merilo na sliki e predstavlja 120 m in velja za vse slike.