

## Białko 14-3-3 w diagnostyce sporadycznej choroby Creutzfeldta-Jakoba

### 14-3-3 protein in diagnostics of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease

Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Adres do korespondencji: Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź, tel.: 42 675 76 29, e-mail: golanska@wp.pl

Autorzy dedykują sympozjum pamięci Prof. Huberta Kwiecińskiego

Praca finansowana ze środków własnych i z grantu MNiSW nr N/N401/571838

#### Streszczenie

Choroba Creutzfeldta-Jakoba (CJD) należy do grupy chorób wywoływanych przez priony, w których do ustalenia definitywnego rozpoznania konieczne jest badanie neuropatologiczne mózgu. Przyżyciowo można chorobę zdiagnozować jako możliwą lub prawdopodobną, zgodnie z kryteriami zalecanymi przez Światową Organizację Zdrowia. W kryteriach diagnostycznych dla sporadycznej postaci CJD (sCJD) uwzględniono marker biochemiczny – dodatni wynik testu na obecność białka 14-3-3 w płynie mózgowo-rdzeniowym. W nowych zmodyfikowanych kryteriach dla sCJD, obowiązujących od 2010 roku, znajduje się również badanie mózgu metodą rezonansu magnetycznego wykonanego w sekwencji FLAIR lub DWI. Białka z grupy 14-3-3 są prawidłowymi białkami neuronalnymi, uwalnianymi do płynu mózgowo-rdzeniowego na skutek obumierania komórek, jest to zatem nieswoisty marker śmierci neuronów. Czulość testu na obecność białka 14-3-3 może być wysoka, zależy jednak od podtypu molekularnego, tempa rozwoju choroby i etapu choroby, na którym wykonano nakłucie lędźwiowe. Dodatni wynik testu pozwala na zmianę klasyfikacji choroby z możliwej na prawdopodobną, ale tylko w połączeniu z innymi kryteriami diagnostycznymi. Rozpatrywanie wyniku – zarówno ujemnego, jak dodatniego – w oderwaniu od kontekstu klinicznego może wprowadzać w błąd. Białko 14-3-3 wykrywa się w około 90% przypadków sCJD oraz jedynie w 50% przypadków wariantu CJD (vCJD), zatem w vCJD badanie posiada dużo mniejsze znaczenie.

**Słowa kluczowe:** choroba Creutzfeldta-Jakoba, białko 14-3-3, marker biochemiczny, płyn mózgowo-rdzeniowy, badania diagnostyczne

#### Summary

Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) belongs to a group of transmissible spongiform encephalopathies in which neuropathological confirmation is needed for a definite diagnosis. Based on clinical symptoms, the disease can be characterized only as possible or probable. The diagnostic criteria for sporadic CJD (sCJD) approved by the World Health Organization include 14-3-3 protein as a marker detectable in the cerebrospinal fluid (CSF). Since 2010, also magnetic resonance FLAIR or DWI imaging has been included in the criteria for sCJD. 14-3-3 protein is a normal neuronal protein released to the CSF as a result of extensive neuronal damage. As it is a non-specific marker, a positive result gives no information about the reason of the neuronal death. The test for 14-3-3 protein is useful only when considered in an appropriate clinical context, together with other diagnostic criteria. In certain conditions, false negative as well as false positive results are possible. The 14-3-3 protein is detected in about 90% of sporadic CJD cases, whereas the result is positive in only 50% of variant CJD patients, therefore this analysis is less useful in the diagnostics of vCJD.

**Key words:** Creutzfeldt-Jakob disease, 14-3-3 protein, biochemical marker, cerebrospinal fluid, diagnostic tests

**C**horoba Creutzfeldta-Jakoba (*Creutzfeldt-Jakob disease*, CJD) należy do grupy chorób neurodegeneracyjnych wywoływanych przez priony, u podstaw których leży przekształcenie prawidłowego komórkowego białka PrP<sup>c</sup> w jego patologiczną izoformę PrP<sup>Sc</sup>, polegające na zmianie struktury przestrzennej białka<sup>(1)</sup>. W sporadycznej postaci choroby (sCJD) konwersja PrP<sup>c</sup> – PrP<sup>Sc</sup> uważana jest za samoistną, natomiast w wariantach CJD (vCJD) spowodowana jest spożyciem mięsa krów zarażonych encefalopatią gąbczastą bydła (BSE)<sup>(2)</sup>. Z kolei postać jatrogena (iCJD) jest wynikiem przeniesienia choroby od przypadków z sCJD z powodu stosowania hormonów przysadki mózgowej uzyskiwanych ze zwłok oraz przeszczepów rogówki i opony twardej<sup>(3)</sup>. Jedynie postać rodzinna (fCJD) ma przyczynę genetyczną w postaci mutacji punktowych w obrębie genu *PRNP*, kodującego białko prionu<sup>(4)</sup>. Najczęściej spotykaną postacią choroby jest sporadyczna CJD, która występuje z częstością 1-2 przypadki na milion osób w populacji na rok<sup>(5)</sup>. Postać rodzinna jest bardzo rzadka i stanowi poniżej 15% wszystkich zachorowań<sup>(4)</sup>. Zgodnie z informacjami podanymi przez brytyjski ośrodek referencyjny National CJD Surveillance Unit w Edynburgu dotychczas na świecie zanotowano 222 przypadki wariantu CJD, z czego większość (174) w Wielkiej Brytanii<sup>(6)</sup>. Pesymistyczne przewidywania dotyczące potencjalnego wybuchu epidemii tej choroby wśród ludzi jak dotąd nie potwierdziły się i obecnie liczba zachorowań spada<sup>(7)</sup>. W Polsce prevalencja sporadycznej CJD wynosi 0,25-0,9 przypadków/milion rocznie, co może świadczyć o tym, że część przypadków choroby pozostaje nierozpoznana. W naszym kraju nie zanotowano dotąd żadnego przypadku wariantu CJD.

Niezależnie od postaci CJD do ustalenia ostatecznego rozpoznania konieczne jest badanie neuropatologiczne mózgu – nie istnieją nieinwazyjne badania pozwalające na definitywną przyżyciową diagnozę. Na podstawie danych klinicznych chorobę klasyfikuje się jako możliwą lub prawdopodobną, zgodnie z kryteriami diagnostycznymi zalecanymi przez Światową Organizację Zdrowia. Stosowane dotychczas kryteria dla sporadycznej CJD obejmowały występowanie takich objawów, jak: szybko postępujące otępienie, mioklonie, zaburzenia widzenia

lub mózdkowe, objawy piramidowe lub pozapiramidowe, mutyzm akinetyczny, a także charakterystyczny zapis EEG z periodycznie występującymi falami wolnymi i ostrymi i/lub obecność białka 14-3-3 w płynie mózgowo-rdzeniowym<sup>(8)</sup>. W roku 2010 do kryteriów diagnostycznych dla sCJD włączono również badanie mózgu za pomocą rezonansu magnetycznego, metodą obrazowania zależnego od dyfuzji (*diffusion-weighted*, DWI) lub tłumienia sygnału wolnego płynu (*fluid attenuated inversion recovery*, FLAIR)<sup>(9)</sup>. Badanie powinno być wykonane aparatem wysokopolowym (minimum 1,5 T). Hiperintensywny sygnał w jądrach kresomózgowia (w jądrze ogoniastym i w skorupie) lub w przynajmniej dwóch regionach kory (skroniowym, ciemieniowym, potylicznym) posiada podobne znaczenie diagnostyczne jak charakterystyczny zapis EEG oraz białko 14-3-3<sup>(9)</sup>. Obowiązujące obecnie kryteria diagnostyczne dla sCJD zamieszczono w tabeli 1.

Niestety, nie dysponujemy badaniami laboratoryjnymi swoistymi wyłącznie dla CJD, które umożliwiłyby jednoznaczne rozpoznanie choroby za życia pacjenta. W diagnostyce CJD mogą być pomocne markery biochemiczne – białka wykrywane w płynie mózgowo-rdzeniowym, takie jak białko 14-3-3, MAP- $\tau$ <sup>(3)</sup>, S-100b czy enolaza swoista dla neuronów (*neuron-specific enolase*, NSE)<sup>(12-13)</sup>. Spośród wymienionych markerów test na obecność białka 14-3-3 został uwzględniony w kryteriach diagnostycznych dla sporadycznej CJD i jest wykonywany rutynowo we wszystkich europejskich ośrodkach zajmujących się diagnostyką i nadzorem nad CJD. W Polsce badania takie wykonywane są w Krajowym Ośrodku Referencyjnym Chorób Wywoływanych przez Priony, działającym przy Zakładzie Patologii Molekularnej i Neuropatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Białka z grupy 14-3-3 są konserwatywnymi białkami obecnymi w cytoplazmie neuronów, które pełnią rolę w transdukcji sygnału, kontroli cyklu komórkowego i apoptozie<sup>(14)</sup>. Należy zaznaczyć, że są to białka prawidłowe, których fizjologiczna funkcja nie ma bezpośredniego powiązania z patogenezą chorób wywoływanych przez priony. W teście diagnostycznym wykorzystuje się tylko fakt, iż białka te w warunkach prawidłowych występują w neuronach, a ich pojawienie się w płynie mózgowo-rdzeniowym

<b>I. Szybko postępujące otępienie</b>
<b>II. Inne objawy kliniczne:</b> a. mioklonie b. zaburzenia widzenia lub mózdkowe c. objawy piramidowe lub pozapiramidowe d. mutyzm akinetyczny
<b>III. Wyniki badań:</b> a. typowy EEG z periodycznie występującymi falami wolnymi i ostrymi (niezależnie od czasu trwania choroby) b. dodatni wynik badania białka 14-3-3 w płynie mózgowo-rdzeniowym (przy chorobie trwającej poniżej 2 lat) c. wzmocniony sygnał w jądrze ogoniastym i w skorupie lub w przynajmniej dwóch regionach korowych (skroniowy – ciemieniowy – potyliczny) w rezonansie magnetycznym w sekwencji FLAIR lub DWI
<b>Choroba definitywna:</b> Typowy obraz neuropatologiczny i/lub stwierdzenie złożeń PrP (immunohistochemicznie) i/lub PrP opornego na proteinazę K (Western blotting), i/lub włókienek związanych ze scrapie <b>Choroba prawdopodobna:</b> I i przynajmniej 2 objawy z punktu II, i przynajmniej 1 wynik dodatni z punktu III, i rutynowe badania nie wskazują na inne rozpoznanie <b>Choroba możliwa:</b> I i przynajmniej 2 objawy z punktu II, i czas trwania choroby poniżej 2 lat, i rutynowe badania nie wskazują na inne rozpoznanie

Tabela 1. Kryteria diagnostyczne dla sporadycznej choroby Creutzfeldta-Jakoba obowiązujące od 2010 roku<sup>(10-11)</sup>

świadczy o rozpadzie tkanek mózgu, przy czym stężenie tych białek w płynie osiąga wykrywalny poziom w przypadku intensywnego obumierania neuronów, jak to ma miejsce na przykład w sporadycznej CJD. Ponieważ jednak śmierć neuronów może towarzyszyć również innym chorobom, niezwiązanym z prionami, białko 14-3-3 może być traktowane jako nieswoisty marker rozpadu neuronów, nie zaś jako test wskazujący jednoznacznie na CJD<sup>(15-16)</sup>.

Białko 14-3-3 w płynie mózgowo-rdzeniowym wykrywa się metodą Western blotting, która nie jest metodą ilościową – pozwala na uzyskanie wyniku dodatniego (obecność) lub ujemnego (brak białka 14-3-3 w płynie). Wszystkie ośrodki wykonujące badania laboratoryjne w CJD napotykają na trudności w interpretacji wyników słabo dodatnich, w których stwierdza się śladowe ilości białka 14-3-3. Niestety, nie dysponujemy ustalonymi standardami dotyczącymi progu wykrywalności białka, interpretacji wyników na granicy wykrywalności czy próbek kontrolnych, do których odnosi się uzyskane wyniki. Wprowadzenie międzynarodowych norm, wspólnych dla wszystkich laboratoriów wykonujących tego typu badania, ułatwiłoby interpretację wyników i umożliwiłoby ich wiarygodne porównywanie, standardy takie jednak nie zostały dotąd opracowane.

Czułość metody wykrywania białka 14-3-3 podawana w literaturze wynosi od 44%<sup>(17)</sup> do 100%<sup>(18)</sup>; ogółem przyjmuje się, że białko to stwierdza się u około 90% chorych ze sporadyczną postacią CJD<sup>(19-20)</sup>. Swoistość testu zmienia się od 74%<sup>(17)</sup> do 100%<sup>(20)</sup>. Autorzy niniejszego opracowania pragną podkreślić, iż dodatni wynik badania nie dostarcza informacji na temat przyczyny uszkodzenia neuronów i pojawienia się białka 14-3-3 w płynie mózgowo-rdzeniowym. Wynik badania – zarówno dodatni, jak i ujemny – może być rozpatrywany tylko w powiązaniu z pozostałymi kryteriami diagnostycznymi dla CJD, w przeciwnym wypadku może wprowadzać w błąd. Zgodnie z zaleceniami WHO wskazaniem do wykonania takiego badania jest uzasadnione klinicznie podejrzenie sCJD, to znaczy spełnione kryteria przynajmniej dla możliwej sCJD oraz choroba trwająca poniżej dwóch lat. W takim przypadku wynik dodatni pozwala na zmianę klasyfikacji choroby z możliwej na prawdopodobną<sup>(8)</sup>. Ponieważ jednak u około 10% przypadków potwierdzonej sporadycznej CJD nie wykrywa się białka 14-3-3, wynik ujemny nie wyklucza sCJD, o ile pozostałe kryteria diagnostyczne wskazują na takie właśnie rozpoznanie. Przypadki ujemne pod względem białka 14-3-3 charakteryzują się często dłuższym czasem trwania choroby lub nietypowym przebiegiem klinicznym<sup>(21-22)</sup>. Z kolei wynik dodatni nie przemawia za prawdopodobnym rozpoznaniem sCJD przy niezgodności z innymi kryteriami. Lista różnorodnych chorób, w których wykrywano białko 14-3-3 w płynie mózgowo-rdzeniowym, jest długa i obejmuje: stany zapalne w ośrodkowym układzie nerwowym – bakteryjne lub wirusowe zapalenia opon mózgowych<sup>(15)</sup>, zapalenia mózgu<sup>(18)</sup>, rdzenia<sup>(23)</sup>; udar niedokrwienno<sup>(24)</sup>, krwotoki domózgowe<sup>(25)</sup>, otepienie naczyniopochodne<sup>(26)</sup>; choroby neurodegeneracyjne niezwiązane z prionami: pojedyncze przypadki choroby Alzheimera<sup>(25)</sup>, otepienia z ciałami Lewy'ego<sup>(26)</sup>; encefalopatię Hashimoto<sup>(27)</sup>, niedotlenienie mózgu, zespół MELAS<sup>(15)</sup>, choroby demielinizujące, w tym stwardnienie rozsiane<sup>(28)</sup> i zespół Guillaina-Barrégo<sup>(29)</sup>, zespoły paraneoplastyczne<sup>(26)</sup>, mielopatię

o podłożu wirusowym<sup>(30)</sup>, hiperkalcemię<sup>(25)</sup> i inne. Wyniki dodatnie otrzymywane w chorobie Alzheimera dotyczą zwłaszcza przypadków o wyjątkowo szybkim przebiegu, które klinicznie mogą przypominać sporadyczną CJD<sup>(31,32)</sup>. Wynik fałszywie dodatni jest możliwy również w przypadku kontaminacji płynu komórkami lub białkami surowicy<sup>(26)</sup>. W Ośrodku Referencyjnym Chorób Wywoływanych przez Priony poza przypadkami z podejrzeniem CJD białko 14-3-3 wykrywano również w stanach zapalnych ośrodkowego układu nerwowego oraz w przypadku nowotworu w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Znaczące skrwawienie płynu także powodowało wynik dodatni. Zanotowano również przypadek, w którym nie wykryto białka 14-3-3, a który został potwierdzony neuropatologicznie jako sporadyczna CJD. W polskich warunkach trudno jest jednak oszacować ogólny procent wyników fałszywie ujemnych, ponieważ w przypadkach ujemnych pod względem 14-3-3 często odstępuje się od wykonania autopsji, z tego powodu nie są możliwe definitywne rozpoznania.

W niektórych publikacjach pojawiły się informacje dotyczące małej wrażliwości białka 14-3-3 na temperaturę przechowywania oraz zamrażanie i odmrażanie próbek<sup>(18,33)</sup>. Doniesienia takie należałoby jednak potraktować z ostrożnością; istotnie, białko 14-3-3 jest stosunkowo wytrzymałe w porównaniu z innymi preparatami białkowymi, wymagającymi bardziej restrykcyjnych metod postępowania, nie oznacza to jednak zupełnej dowolności co do warunków przechowywania materiału do badania. Z doświadczeń własnych autorów niniejszego artykułu wynika, że temperatura, w jakiej przechowywane są próbki płynu mózgowo-rdzeniowego, nie jest obojętna – w temperaturze otoczenia białko ulega stopniowej degradacji, co może skutkować wynikiem fałszywie ujemnym, jeśli wyjściowa ilość białka w badanej próbce była niewielka. Jeśli zatem wyniki badań diagnostycznych mają być z całą pewnością wiarygodne i wzajemnie porównywalne oraz jeśli chcemy uniknąć wątpliwości co do interpretacji wyników ujemnych, próbki płynu powinny być przechowywane w jak najniższej temperaturze (najlepiej -70°C) oraz transportowane w postaci zamrożonej.

Poziom białka 14-3-3 w płynie mózgowo-rdzeniowym – a zatem również jego wykrywalność – może różnić się w zależności od etapu choroby, w którym wykonano badanie. Opisywane w literaturze wyniki są jednak rozbieżne: niektórzy autorzy uzyskali wyższą czułość testu u chorych, od których płyn mózgowo-rdzeniowy pobrano w początkowej fazie choroby<sup>(34-35)</sup>, inni z kolei stwierdzili wzrost poziomu białka 14-3-3 w czasie trwania choroby<sup>(36)</sup> lub brak związku pomiędzy uzyskanym wynikiem a czasem, w którym wykonano nakłucie lędźwiowe<sup>(37)</sup>. Różne wyniki badań laboratoryjnych mogą odzwierciedlać kliniczną i molekularną heterogenność sCJD. Czas trwania choroby i intensywność jej przebiegu – a co się z tym wiąże, pojawienie się i poziom białka 14-3-3 w płynie – mogą różnić się w zależności od podtypu choroby oraz cech molekularnych (charakteryzowanych w oparciu o polimorfizm w kodonie 129. genu *PRNP* – Met lub Val oraz masę cząsteczkową białka PrP<sup>Sc</sup> – izotyp 1. lub 2.)<sup>(38,39)</sup>. Stwierdzono, iż procent wyników dodatnich wśród chorych na sCJD (bądź poziom białka 14-3-3 mierzony ilościowo, w zależności od rodzaju metody stosowanej w danej analizie) jest najwyższy

w przypadkach o typowym przebiegu, natomiast może być obniżony u chorych w młodszym wieku, z długim czasem trwania choroby lub o nietypowych objawach klinicznych. Zgodnie z powyższą obserwacją są doniesienia o wyższej czułości badania u chorych z molekularnym podtypem białka prionu MM1 (z reguły o typowym przebiegu) oraz o niższej czułości – w przypadkach z białkiem PrP o izotypie MM2 lub MV2 (często związanym z dłuższym czasem trwania lub nietypowym przebiegiem choroby)<sup>(35,37,40-41)</sup>.

Oprócz białka 14-3-3 część laboratoriów zajmujących się diagnostyką oraz badaniami naukowymi w chorobach wywoływanych przez priony wykonuje również analizy innych markerów biochemicznych wykrywanych w płynie mózgowo-rdzeniowym, do których zalicza się głównie białko tau oraz S100b. Badania takie mają charakter ilościowy i zwykle wykonywane są metodą ELISA. Stężenie danego białka stwierdzone w badanym materiale odnosi się do wartości progowej, którą ustala się eksperymentalnie. W płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z CJD stwierdzono zwiększone stężenie białka S100b oraz całkowitego białka tau (*total tau*, t-tau)<sup>(40,42-43)</sup>. Ponieważ podwyższenie poziomu ufosforylowanej postaci białka tau (P-tau) jest charakterystyczne dla choroby Alzheimera, większą wartość w diagnostyce CJD mogłoby posiadać oznaczenie stosunku stężenia t-tau/P-tau<sup>(42)</sup>. Istotnie, oznaczenie takie pozwalało na odróżnienie CJD od innych chorób neurodegeneracyjnych<sup>(44-45)</sup>. Niektórzy autorzy wykazali wyższą czułość oraz wartość diagnostyczną białka 14-3-3 jako markera w sporadycznej CJD w porównaniu z białkiem tau, inni z kolei stwierdzili wyższą swoistość testu dla białka tau w porównaniu z 14-3-3<sup>(40,42,46)</sup>. Podwyższoną czułość i swoistość można natomiast uzyskać dla kombinacji oznaczeń dwóch markerów, w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla każdego z markerów oddzielnie<sup>(40,43)</sup>, chociaż trzeba również nadmienić, że niektórzy autorzy stwierdzili obniżenie czułości testu przy łącznym rozpatrywaniu wyników dla więcej niż jednego markera<sup>(35)</sup>.

W roku 2010 autorzy z przodującego w Europie brytyjskiego ośrodka referencyjnego National CJD Surveillance Unit w Edynburgu opublikowali podsumowanie 10-letniego doświadczenia w wykonywaniu badań płynu mózgowo-rdzeniowego w sCJD. Wśród badanych markerów znalazły się białko 14-3-3, tau i S100b. Największą czułość posiadał dodatni wynik testu na obecność białka 14-3-3 (86%); czułość dla oznaczeń białka tau oraz S100b wynosiła odpowiednio 81% i 65%. Najwyższą dodatnią wartość predykcyjną dla sCJD stwierdzono natomiast dla kombinacji wszystkich trzech markerów analizowanych łącznie<sup>(47)</sup>.

Trzeba podkreślić, że żaden omówiony powyżej marker ani wynik badania, na przykład obrazowego, nie jest swoisty wyłącznie dla sCJD. Podobnie jak w przypadku białka 14-3-3, zarówno podwyższony poziom białka tau, jak i charakterystyczny obraz MRI mogą pojawić się również w innych chorobach, przy czym wśród chorób mogących dawać wyniki fałszywie dodatnie na pierwszym miejscu wymieniane są stany zapalne w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, rzadziej również choroby neurodegeneracyjne niezwiązane z prionami oraz inne schorzenia neurologiczne<sup>(9,46)</sup>. Międzynarodowy zespół autorów, który zaproponował włączenie rezonansu magnetycznego do kryteriów diagnostycznych sCJD, dokonał analizy trzech badań: EEG,

białka 14-3-3 i MRI, pod kątem ich przydatności w diagnostyce<sup>(9)</sup>. W grupie analizowanych 291 pacjentów, pochodzących z 12 krajów Europy, charakterystyczny obraz rezonansu magnetycznego zaobserwowano w 83% definitywnych przypadków sCJD, natomiast swoistość tego badania wynosiła 83%. Czułość testu dla białka 14-3-3 osiągnęła poziom 86% przy niższej swoistości (68%). Natomiast wynik EEG miał najniższą czułość (44%), ale najwyższą swoistość (92%). Ogółem czułość dla nowych kryteriów diagnostycznych łącznie, uwzględniających objawy kliniczne i wszystkie trzy badania (EEG, MRI, białko 14-3-3), osiągnęła wartość 98% przy swoistości rzędu 71%<sup>(9)</sup>.

Wszystkie powyższe informacje dotyczyły sporadycznej postaci CJD. W vCJD białko 14-3-3 wykrywa się tylko u około 50% chorych, prawdopodobnie z powodu dłuższego czasu trwania choroby i bardziej powolnego rozpadu neuronów w mózgu<sup>(48)</sup>. W diagnostyce tej postaci choroby badanie białka 14-3-3 jest zatem znacznie mniej użyteczne.

Pomimo postępu technik obrazowych i laboratoryjnych nadal nie dysponujemy żadnym badaniem, które umożliwiłoby pewne rozpoznanie przyżyciowe. Optymalnym rozwiązaniem byłoby zastosowanie markera specyficznego dla CJD, jakim mogłaby być patologiczna izoforma białka prionu, z całą pewnością nieobecna w innych chorobach. Wykrycie białka PrP<sup>Sc</sup> wymaga jednak zbadania próbki mózgu, której nie da się otrzymać nieinwazyjnie – badanie może być wykonane dopiero po autopsji (lub ewentualnie biopsji mózgu)<sup>(48)</sup>. Stężenie białka PrP<sup>Sc</sup> w łatwym do pozyskania materiale, na przykład w krwi lub płynie mózgowo-rdzeniowym, jest zbyt niskie i niewykrywalne powszechnie dostępnymi metodami, takimi jak Western blotting czy ELISA. W różnych ośrodkach naukowych na świecie podejmowano próby opracowania nowych, bardziej dokładnych metod, które mogłyby posłużyć do takiego celu, opartych na indukowanej *in vitro* konwersji PrP<sup>C</sup> w PrP<sup>Sc</sup> i amplifikacji nieprawidłowej izoformy tego białka<sup>(49-51)</sup>. Uzyskane wyniki były obiecujące, miały jednak charakter wyłącznie wstępnych doniesień naukowych, jak dotąd bez praktycznego zastosowania. Dopóki nie zostaną opracowane wysokoczułe metody możliwe do zastosowania w diagnostyce, możemy się posługiwać tylko takimi testami, jakie są obecnie dostępne w badaniach rutynowych. Pomimo niewątpliwych wad i ograniczeń badania białka 14-3-3 nadal pozostaje ono jedynym biomarkerem włączonym do kryteriów diagnostycznych CJD. Pozostałe markery mogą mieć znaczenie pomocnicze, na przykład w przypadkach ze słabo dodatnim wynikiem dla 14-3-3 lub też u chorych w młodszym wieku z dłuższym czasem trwania choroby<sup>(40)</sup>.

#### PIŚMIENNICTWO:

##### BIBLIOGRAPHY:

1. Prusiner S.B.: Molecular biology of prion diseases. *Science* 1991; 252: 1515-1522.
2. Will R.G., Ironside J.W., Zeidler M. i wsp.: A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; 347: 921-925.
3. Blättler T.: Implications of prion diseases for neurosurgery. *Neurosurg. Rev.* 2002; 25: 195-203.

4. Kovács G.G., Puopolo M., Ladogana A. i wsp.: Genetic prion disease: the EURO-CJD experience. *Hum. Genet.* 2005; 118: 166-174.
5. Will R.G., Alperovitch A., Poser S. i wsp.: Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in six European countries, 1993-1995. EU Collaborative Study Group for CJD. *Ann. Neurol.* 1998; 43: 763-767.
6. Variant Creutzfeldt-Jakob disease current data (January 2011). Adres: <http://www.cjd.ed.ac.uk/vcjdworld.htm>.
7. Will R.: Variant CJD: where has it gone, or has it? *Pract. Neurol.* 2010; 10: 250-251.
8. World Health Organization. Global surveillance, diagnosis and therapy of human Transmissible Spongiform Encephalopathies: Report of a WHO consultation. Geneva, 1998; adres: [http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO EMC\\_ZDI\\_98.9.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO EMC_ZDI_98.9.pdf)
9. Zerr I., Kallenberg K., Summers D.M. i wsp.: Updated clinical diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 2009; 132: 2659-2668.
10. CDC's Diagnostic Criteria for Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD), 2010, Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA. Adres: [http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/cjd/diagnostic\\_criteria.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/cjd/diagnostic_criteria.html).
11. National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance diagnostic criteria. Adres: <http://www.cjd.ed.ac.uk/criteria.htm>.
12. Jimi T., Wakayama Y., Shibuya S. i wsp.: High levels of nervous system-specific proteins in cerebrospinal fluid in patients with early stage Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin. Chim. Acta* 1992; 211: 37-46.
13. Kropp S., Zerr I., Schulz-Schaeffer W.J. i wsp.: Increase of neuron-specific enolase in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci. Lett.* 1999; 261: 124-126.
14. Fu H., Subramanian R.R., Masters S.C.: 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000; 40: 617-647.
15. Satoh J., Kurohara K., Yukitake M., Kuroda Y.: The 14-3-3 protein detectable in the cerebrospinal fluid of patients with prion-unrelated neurological diseases is expressed constitutively in neurons and glial cells in culture. *Eur. Neurol.* 1999; 41: 216-225.
16. Burkhard P.R., Sanchez J.C., Landis T., Hochstrasser D.F.: CSF detection of the 14-3-3 protein in unselected patients with dementia. *Neurology* 2001; 56: 1528-1533.
17. Blennow K., Johansson A., Zetterberg H.: Diagnostic value of 14-3-3beta immunoblot and T-tau/P-tau ratio in clinically suspected Creutzfeldt-Jakob disease. *Int. J. Mol. Med.* 2005; 16: 1147-1149.
18. Van Everbroeck B., Quoilin S., Boons J. i wsp.: A prospective study of CSF markers in 250 patients with possible Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2003; 74: 1210-1214.
19. Zerr I., Pocchiari M., Collins S. i wsp.: Analysis of EEG and CSF 14-3-3 proteins as aids to the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2000; 55: 811-815.
20. Beaudry P., Cohen P., Brandel J.P. i wsp.: 14-3-3 protein, neuron-specific enolase, and S-100 protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 1999; 10: 40-46.
21. Green A.J.: Use of 14-3-3 in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Biochem. Soc. Trans.* 2002; 30: 382-386.
22. Zerr I., Schulz-Schaeffer W.J., Giese A. i wsp.: Current clinical diagnosis in Creutzfeldt-Jakob disease: identification of uncommon variants. *Ann. Neurol.* 2000; 48: 323-329.
23. Finsterer J., Voigtländer T.: Elevated 14-3-3 protein and axonal loss in immunoglobulin-responsive, idiopathic acute transverse myelitis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2002; 105: 18-22.
24. Lemstra A.W., van Meegen M.T., Vreyling J.P. i wsp.: 14-3-3 testing in diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease: a prospective study in 112 patients. *Neurology* 2000; 55: 514-516.
25. Huang N., Marie S.K., Livramento J.A. i wsp.: 14-3-3 protein in the CSF of patients with rapidly progressive dementia. *Neurology* 2003; 61: 354-357.
26. Cuadrado-Corrales N., Jiménez-Huete A., Albo C. i wsp.: Impact of the clinical context on the 14-3-3 test for the diagnosis of sporadic CJD. *BMC Neurol.* 2006; 6: 25.
27. Hernández-Echebarría L.E., Saiz A., Graus F. i wsp.: Detection of 14-3-3 protein in the CSF of a patient with Hashimoto's encephalopathy. *Neurology* 2000; 54: 1539-1540.
28. Colucci M., Roccatagliata L., Capello E. i wsp.: The 14-3-3 protein in multiple sclerosis: a marker of disease severity. *Mult. Scler.* 2004; 10: 477-481.
29. Bersano A., Fiorini M., Allaria S. i wsp.: Detection of CSF 14-3-3 protein in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 2006; 67: 2211-2216.
30. Satoh J., Yukitake M., Kurohara K. i wsp.: Detection of the 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid of Japanese multiple sclerosis patients presenting with severe myelitis. *J. Neurol. Sci.* 2003; 212: 11-20.
31. Jayaratnam S., Khoo A.K.M., Basic D.: Rapidly progressive Alzheimer's disease and elevated 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid. *Age Ageing* 2008; 37: 467-469.
32. Schmidt C., Redyk K., Meissner B. i wsp.: Clinical features of rapidly progressive Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2010; 29: 371-378.
33. Zerr I., Bodemer M., Gefeller O. i wsp.: Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 1998; 43: 32-40.
34. Geschwind M.D., Martindale J., Miller D. i wsp.: Challenging the clinical utility of the 14-3-3 protein for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Neurol.* 2003; 60: 813-816.
35. Pennington C., Chohan G., Mackenzie J. i wsp.: The role of cerebrospinal fluid proteins as early diagnostic markers for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci. Lett.* 2009; 455: 56-59.
36. Giraud P., Biacabe A.G., Chazot G. i wsp.: Increased detection of 14-3-3 protein in cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease during the disease course. *Eur. Neurol.* 2002; 48: 218-221.
37. Collins S.J., Sanchez-Juan P., Masters C.L. i wsp.: Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 2006; 129: 2278-2287.
38. Parchi P., Giese A., Capellari S. i wsp.: Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann. Neurol.* 1999; 46: 224-233.
39. Parchi P., Castellani R., Capellari S. i wsp.: Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 1996; 39: 767-778.
40. Baldeiras I.E., Ribeiro M.H., Pacheco P. i wsp.: Diagnostic value of CSF protein profile in a Portuguese population of sCJD patients. *J. Neurol.* 2009; 256: 1540-1550.
41. Gmitterová K., Heinemann U., Bodemer M. i wsp.: 14-3-3 CSF levels in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease differ across molecular subtypes. *Neurobiol. Aging* 2009; 30: 1842-1850.
42. Skinningsrud A., Stenset V., Gundersen A.S., Fladby T.: Cerebrospinal fluid markers in Creutzfeldt-Jakob disease. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2008; 5: 14.
43. Bahl J.M., Heegaard N.H., Falkenhorst G. i wsp.: The diagnostic efficiency of biomarkers in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease compared to Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2009; 30: 1834-1841.
44. Riemenschneider M., Wagenpfeil S., Vanderstichele H. i wsp.: Phospho-tau/total tau ratio in cerebrospinal fluid discriminates Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias. *Mol. Psychiatry* 2003; 8: 343-347.

45. Satoh K., Shirabe S., Eguchi H. i wsp.: 14-3-3 protein, total tau and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease and neurodegenerative disease in Japan. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2006; 26: 45-52.
46. Meiner Z., Kahana E., Baitcher F. i wsp.: Tau and 14-3-3 of genetic and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients in Israel. *J. Neurol.* 2011; 258: 255-256.
47. Chohan G., Pennington C., Mackenzie J.M. i wsp.: The role of cerebrospinal fluid 14-3-3 and other proteins in the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in the UK: a 10-year review. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2010; 81: 1243-1248.
48. Green A.J., Thompson E.J., Stewart G.E. i wsp.: Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2001; 70: 744-748.
49. Orrú C.D., Wilham J.M., Hughson A.G. i wsp.: Human variant Creutzfeldt-Jakob disease and sheep scrapie PrP<sup>res</sup> detection using seeded conversion of recombinant prion protein. *Protein Eng. Des. Sel.* 2009; 22: 515-521.
50. Murayama Y., Yoshioka M., Masujin K. i wsp.: Sulfated dextrans enhance *in vitro* amplification of bovine spongiform encephalopathy PrP<sup>Sc</sup> and enable ultrasensitive detection of bovine PrP<sup>Sc</sup>. *PLoS One* 2010; 5: e13152.
51. Atarashi R., Satoh K., Sano K. i wsp.: Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat. Med.* 2011; 17: 175-178.