

## Matching grant 09I01-03-V04-00039

### Monitorovacia správa – záverečná

#### Popis činností uskutočnených v rámci projektu počas monitorovacieho obdobia

V rámci pracovného balíka NV1 sme sa v záverečnej etape zamerali na zdokonalenie metódy izolácie extracelulárnych vezikúl (EV) a následne neuronálnych extracelulárnych vezikúl (NEV) z biologických tekutín. Ako najvhodnejší spôsob izolácie NEV sa ukázala kombinácia chromatografického prístupu pomocou gélovej filtrácie, pri ktorej dochádza k izolácii vezikúl na základe ich veľkosti s následným obohatením NEV pomocou imunoselekcie s protilátkou proti NCAM-L1. Veľkosť extracelulárnych vezikúl je približne 50-100 nm a práve na základe tejto ich vlastnosti je možné izolovať extracelulárne vezikuly z krvnej plazmy pomocou gélovej filtrácie [1,2]. K pôvodným dvom testovaným kolónkam (qEV20 a qEV35) sme pridali ďalší typ kolóny, qEVoriginal-70 (Izon Sciences). Výrobca uvádza, že by malo byť možné izolovať častice o veľkosti 20–100 nm v prípade qEV20, 35–400 nm v prípade qEV35 a 70–2000 nm v prípade qEVoriginal-70. V jednotlivých frakciách sme analyzovali dva parametre – veľkosť častíc pomocou dynamic light scattering (DLS) a koncentráciu voľných proteínov, ktoré predstavujú kontaminujúcu zložku a znižujú účinnosť nasledujúceho imunoselekčného kroku. Spomedzi testovaných kolón sa ukázala ako najvhodnejšia kolónka qEV35. Minimálny obsah proteínov bol identifikovaný vo frakciách F2–7, kým pri kolóne qEV 20 bolo väčšie množstvo proteínov identifikované už vo frakciách od F5. V prípade kolóny qEVoriginal-70 boli ako vhodné, t. j. s minimálnym obsahom kontaminujúcich proteínov, identifikované frakcie F2–6 (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 1A**). Aj DLS (SpectroLight 600/610, Xtal Concepts) analýza ukázala, že homogenita a zastúpenie častíc sú najoptimálnejšie pri použití kolóny qEV35 (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 1B, C**). Pre porovnanie sme vybrané vzorky tiež podrobili meraniu pomocou metódy Nanoparticle Tracking Analysis (NTA, NanoSight Pro, Malvern Panalytical Ltd.). Analýza naznačila, že sú prítomné vezikuly s priemerom  $141 \pm 47$  nm v približnej koncentrácii  $1,5 \times 10^{12} \pm 7,4 \times 10^{11}$  (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 1D**). Reprodukovateľnosť izolácie bola následne overená na viacerých nezávislých plazmatických vzorkách spracovaných v rôznych experimentálnych dňoch. Pri použití kolóny qEV35 sme opakovane pozorovali porovnateľné rozdelenie častíc vo frakciách F2–F7, nízky obsah kontaminujúcich proteínov a prítomnosť vezikúl vo veľkostnom rozsahu očakávanom pre extracelulárne vezikuly. Výsledky DLS analýz preukázali dobrú reprodukovateľnosť izolačného postupu medzi jednotlivými experimentmi. Zavedený protokol bol následne použitý na spracovanie kontrolných aj patientskych vzoriek a predstavuje štandardizovaný postup pre analýzy RT-QuIC. Následne sme izolovali NEV pomocou imunoobohatenia aplikáciou magnetických guľôčok s naviazanou anti-NCAM-L1 protilátkou. Tento krok by mal zabezpečiť špecifické vychytenie NEV, ktoré by na svojom povrchu mali mať NCAM-L1.

V rámci pracovného balíka NV2 sme súbežne s izoláciou NEV ďalej pokračovali v zavedení metódy RT-QuIC. Hoci bola táto metóda na detekciu  $\alpha$ -synukleínu opísaná vo viacerých publikáciách, nie je rutinne používaná v klinickej praxi a pracovné postupy sa u jednotlivých pracovísk značne líšia. Bolo preto nutné testovať viaceré prístupy a podmienky, čo sa vyznačovalo veľkou časovou a technickou náročnosťou. Optimalizovali sme podmienky, ako sú teplota, spôsob trepania, použitie guľôčok a zloženie reakčnej zmesi, ale ako sa ukázalo, za najväčšiu variabilitu testu zodpovedá substrát, t. j. monomérny rekombinantný  $\alpha$ -synukleín. V našej práci sme testovali najskôr rekombinantný His-tagovaný  $\alpha$ -synukleín, ale vzhľadom na jeho vysokú mieru spontánnej agregácie, ktorá by do testu vnášala falošne pozitívne výsledky, sme zaradili aj prípravu natívneho  $\alpha$ -synukleínu. Rekombinantné  $\alpha$ -synukleíny sme pripravovali expresiou v bunkách *Escherichia coli* a v prípade His-tagovaného  $\alpha$ -synukleínu sme proteíny purifikovali trojkrokovou kvapalinovou chromatografiou: afinitnou, ionomeničovou a gélovou chromatografiou (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 2A**). Podarilo sa nám tiež optimalizovať produkciu a purifikáciu natívneho  $\alpha$ -synukleínu s použitím dvojkrokovej ionomeničovej chromatografie a gélovej filtrácie. Čistota proteínových šarží bola overená pomocou SDS-PAGE. Šarže boli tiež validované na prístroji Octet R2 analýzou ich interakcií s protilátkou Syn-211, rozpoznávajúcou všetky formy  $\alpha$ -synukleínu (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 2B**). Schopnosť väzby na protilátku bola medzi jednotlivými šaržami v porovnaní s komerčne zakúpeným proteínom len malá. Priemerné  $K_D$  pri WT substrátoch boli  $2,6 \times 10^{-10}$ , pre His-tag  $2,5 \times 10^{-10}$ , čo sú hodnoty porovnateľné s  $K_D$  komerčného substrátu ( $1,9 \times 10^{-10}$ ). Následne sme analyzovali šarže aj pomocou DLS (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 2C**). Pripravili sme tak šarže His-tagovaného  $\alpha$ -synukleínu HIS1.1, HIS1.2, HIS2.1, HIS2.2, HIS3.1, HIS3.2 a natívneho  $\alpha$ -synukleínu WT1.1, WT1.2, WT2

a WT3 s porovnateľnou čistotou a biofyzikálnymi charakteristikami. Jednotlivé šarže sme tiež testovali na ich schopnosť agregovať (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 2D**). Po purifikácii sme časti jednotlivých proteínových šarží použili na prípravu seedu, a to inkubáciou a miešaním pri 1000 rpm a teplote 37°C po dobu 9 dní. Následne bola miera agregácie vyhodnotená pomocou sedimentačného testu. Zároveň sme si tak pripravili aj pozitívnu kontrolu, teda iniciátor agregácie („seed“) do testu RT-QulC. Sedimentačný test poukázal na pomerne výraznú inter- aj intravariabilitu jednotlivých šarží. Priemerná hodnota sedimentácie bola  $62,3 \pm 21,3$  % pri His-tagovanom a  $68,0 \pm 19,4$ % pri natívnom proteíne (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 2D**).

V ďalšej etape v rámci pracovného balíka NV2 sme jednotlivé šarže rekombinantného  $\alpha$ -synukleínu testovali a vzájomne porovnali v RT-QulC teste s použitím komerčne dostupného substrátu, a to za prítomnosti alebo bez prítomnosti pozitívnej kontroly vo forme *in vitro* pripravených seedov. Hoci sa jednotlivé šarže významne nelíšili z hľadiska čistoty ani schopnosti väzby na špecifické protilátky stanovené pomocou prístroja Octet R2, sedimentačný test a RT-QulC analýza odhalili určitú variabilitu medzi jednotlivými šaržami, obzvlášť v prípade His-tagovaných proteínov (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 3A-C**). Tieto výsledky poukázali na význam dôslednej charakterizácie a štandardizácie rekombinantného substrátu ako jedného z kľúčových faktorov ovplyvňujúcich reprodukovateľnosť metodiky RT-QulC. Na základe komplexného vyhodnotenia biofyzikálnych vlastností a správania sa jednotlivých šarží v RT-QulC reakcii sme ako najvhodnejší substrát na ďalšie experimenty zvolili šaržu WT2 natívneho  $\alpha$ -synukleínu. Táto šarža vykazovala v porovnaní s ostatnými proteínmi výrazný fluorescenčný signál v prítomnosti pozitívnej kontroly (seedu) a súčasne nízku úroveň spontánnej agregácie bez prítomnosti pozitívnej kontroly. Podarilo sa nám dosiahnuť senzitivitu testu na úrovni 10 ng seedu.

Následne sme pristúpili k pilotnému testovaniu metodiky na EV/NEV izolátoch z kontrolných vzoriek a vzoriek od pacientov s Parkinsonovou chorobou. Napriek viacerým publikovaným štúdiám opisujúcim detekciu patologického  $\alpha$ -synukleínu v extracelulárnych vezikulách izolovaných z krvi pacientov s Parkinsonovou chorobou zatiaľ nebola vyvinutá a klinicky implementovaná štandardizovaná metodika s preukázanou reprodukovateľnosťou naprieč nezávislými laboratóriami [3–5]. Nedávne odborné hodnotenia poukazujú na významné metodické rozdiely medzi jednotlivými štúdiami, najmä v postupoch izolácie neuronálnych extracelulárnych vezikúl, použitých reagensiách a nastavení amplifikačných reakcií, ktoré môžu zásadným spôsobom ovplyvniť výsledky. Súčasne bolo publikované upozornenie na obmedzenú reprodukovateľnosť niektorých doposiaľ publikovaných protokolov a na potrebu ich nezávislej validácie pred zavedením do klinickej praxe [6]. Naše výsledky ukázali, že za aktuálne nastavených podmienok test zatiaľ dosahuje obmedzenú úroveň senzitivity a špecificity potrebnú na jednoznačné odlíšenie pozitívnych a negatívnych vzoriek. Za pozitívne boli považované vzorky, u ktorých fluorescenčný signál presiahol priemer fluorescenčného signálu nameraného v kontrole s ThT plus 5-násobok štandardnej odchylky v aspoň dvoch z troch replikátov. Kým po 24 hodinách inkubácie nevykazovali testované vzorky ani negatívna kontrola bez seedu pozitívny signál, po 30 hodinách dochádzalo k amplifikácii signálu aj v negatívnych kontrolách. Tieto výsledky naznačujú, že koncentrácia patologických agregátov v izolovaných EV/NEV môže byť nižšia, ako je aktuálny detekčný limit metodiky (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 4**). Na zvýšenie citlivosti testu bude pravdepodobne potrebné zvýšiť vstupný objem plazmy použitej na izoláciu EV a NEV, prípadne ďalej optimalizovať jednotlivé kroky izolácie a amplifikačnej reakcie. Takýto prístup však prináša zvýšené nároky na spotrebu biologického materiálu, reagensií a protilátok, čo môže predstavovať limitujúci faktor pri budúcej implementácii metodiky do rutinej klinickej praxe. Napriek týmto obmedzeniam sa podarilo vytvoriť čiastočne funkčný experimentálny systém, identifikovať jeho hlavné limitácie a definovať ďalšie kroky potrebné na zvýšenie analytickej výkonnosti testu.

V pracovnom balíku NV3 sme analyzovali prítomnosť patologických  $\alpha$ -synukleínových agregátov v krvných vzorkách menšej skupiny pacientov zaradených do klinického skúšania zameraného na hodnotenie vplyvu nefarmakologických intervencií u pacientov s demenciou a miernou kognitívnou poruchou v rámci projektu ADDIT-CE. Optimalizovaná metodika  $\alpha$ -Syn RT-QulC bola aplikovaná na EV/NEV izolované z klinických vzoriek. Podobne ako pri validačných experimentoch nebolo možné spoľahlivo odlíšiť pozitívne vzorky od negatívnych (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 5**). Výsledky však poskytli cenné informácie o správaní sa metodiky pri analýze reálnych biologických vzoriek a umožnili identifikovať hlavné faktory limitujúce jej analytickú výkonnosť, predovšetkým nízku koncentráciu patologických agregátov v EV/NEV a vplyv spontánnej agregácie substrátu pri dlhšej inkubácii.

Aj keď modifikovaný RT-QulC test zatiaľ nedosahuje parametre potrebné na rutinné klinické využitie, získané poznatky predstavujú významný metodický prínos. Identifikácia kritických parametrov ovplyvňujúcich citlivosť a špecifitu testu vytvorila pevný základ pre jeho ďalšiu optimalizáciu, štandardizáciu a následnú validáciu na rozsiahlejších klinických súboroch. Na vývoji metodiky pokračujeme aj po ukončení projektu so zameraním na zvýšenie výťažnosti izolácie EV/NEV, optimalizáciu substrátu RT-QulC reakcie a rozšírenie klinickej kohorty pacientov v spolupráci s klinickými pracoviskami v Bratislave.

V rámci riešenia pracovného balíka NV4 sme nadviazali na skúsenosti získané pri vývoji a optimalizácii metodiky  $\alpha$ -syn RT-QulC a zamerali sme sa na vytvorenie pilotnej verzie amplifikačného testu na detekciu patologických agregátov proteínu Tau. V úvodnej fáze boli analyzované dostupné publikované metodiky, vhodné rekombinantné Tau fragmenty a experimentálne podmienky potrebné na efektívnu amplifikáciu Tau agregátov. Následne sme izolovali Tau 40 proteín pomocou afinitnej chromatografie a gélovej filtrácie (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 6A**). Pripravil sa tiež skrátený variant dGAE, z ktorého bola v kombinácii s Tau 40 pripravená pozitívna kontrola (seed) podobným spôsobom ako pri  $\alpha$ -synukleíne (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 6B**). Úroveň agregácie dosahovala až  $74,3 \pm 3,5$  %. V RT-QulC sme testovali rôzne parametre reakcie vrátane prítomnosti guľôčok rôznej veľkosti, podmienok inkubácie, režimu trepania a zloženia reakčnej zmesi. Podarilo sa vytvoriť experimentálny systém schopný detegovať *in vitro* pripravené Tau seedy, ktoré boli použité ako pozitívna kontrola. Výsledky potvrdili, že navrhnutá metodika je schopná amplifikovať patologické Tau agregáty za definovaných experimentálnych podmienok (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 6C**). Senzitivita testu bola však pomerne nízka a boli sme schopní detekovať minimálne 5  $\mu$ g seedu.

Pri prenose metodiky na analýzu EV a NEV sa navyše ukázalo, že niektoré kroky potrebné na spracovanie biologických vzoriek pred pridaním do testu môžu negatívne ovplyvňovať priebeh amplifikačnej reakcie. Ako významný limitujúci faktor sa ukázalo použitie detergentu Triton X-100, ktorý je potrebný na uvoľnenie obsahu vezikúl, avšak súčasne pravdepodobne inhibuje proces seedingu Tau agregátov. Táto skutočnosť významne komplikovala aplikáciu metodiky na klinické vzorky a poukázala na potrebu ďalšej optimalizácie podmienok reakcie (Príloha k záverečnej správe, **Obr. 7**). Podarilo sa však vytvoriť pilotný experimentálny systém pre Tau RT-QulC, identifikovať hlavné faktory ovplyvňujúce jeho funkčnosť a definovať kritické body, ktoré je potrebné riešiť pred jeho aplikáciou na klinický materiál. Získané poznatky predstavujú významný metodický základ pre ďalší vývoj amplifikačných testov zameraných na diagnostiku tauopatií.

Počas riešenia projektu boli nadviazané a rozvinuté viaceré odborné spolupráce, ktoré významne prispeli k realizácii jednotlivých aktivít projektu. Významná spolupráca bola nadviazaná s prof. Martinom Kolískom, ktorý sa podieľal na zabezpečení biologických vzoriek pre experimentálnu časť projektu. Spolupráca zároveň viedla k spoločnej príprave dvoch vedeckých publikácií. Ďalšia spolupráca bola iniciovaná s MUDr. Christianom Terkaničom z Ústrednej vojenskej nemocnice SNP Ružomberok. Táto spolupráca prispieje k vytvoreniu kontaktov na pacientov z regiónu s vyšším výskytom neurodegeneratívnych ochorení, najmä demencií a Parkinsonovej choroby, a predstavuje perspektívny základ pre budúce klinické štúdie a validáciu biomarkerov. V rámci projektu zároveň pokračovala spolupráca s Dr. Jozefom Hritzom, CEITEC, ČR, započatá už v rámci projektu ADDIT-CE. Spolupráca bola zameraná na odborné konzultácie, interpretáciu experimentálnych výsledkov a koordináciu aktivít súvisiacich s vývojom diagnostických prístupov pri neurodegeneratívnych ochoreniach. Projekt tak prispel k ďalšiemu posilneniu existujúcej interdisciplinárnej siete partnerov združených v projekte ADDIT-CE. Dr. Jozef Hritz s ďalším členom jeho tímu, Mgr. Pavle Križanom, sa tiež spolupodieľali na jednej z publikácií. Nadviazané a rozvíjané spolupráce významne podporili realizáciu projektu a vytvorili predpoklady na pokračovanie výskumu a následnú klinickú validáciu vyvíjaných diagnostických metód. V súčasnosti tiež nadväzujeme spoluprácu s ďalšími klinickými pracoviskami v Bratislave.

Výsledky dosiahnuté počas riešenia projektu boli priebežne prezentované odbornej komunite a verejnosti prostredníctvom konferencií, workshopov a odborných prednášok. Významnou súčasťou diseminácie bola pozvanie prednášky „Využitie metódy RT-QulC v diagnostike Parkinsonovej choroby“ na konferencii „Ako veda formuje modernú kúpeľnú liečbu“ a „Alchýmia nefarmakologickej liečby Alzheimerovej choroby - ako kúpeľná terapia“ môže pomôcť pacientom s demenciou (Program Piešťany

2025) a „Miesto balneoterapie v prevencii a adjuvantnej terapii kognitívnych deficitov a Alzheimerovej choroby“ (Program Piešťany 2026). Výsledky projektu boli ďalej prezentované na podujatí AD Workshop No. 5 zameranom na problematiku neurodegeneratívnych ochorení, kde boli diskutované metodické aspekty purifikácie  $\alpha$ -synukleínu, izolácie extracelulárnych vezikúl a možnosti využitia RT-QuIC testov pri detekcii patologických agregátov  $\alpha$ -synukleínu. Projekt bol prezentovaný aj na konferencii Structural Biology and Biophysics Symposium (Bratislava, 2026), kde boli predstavené výsledky súvisiace s prípravou, charakterizáciou a biofyzikálnou analýzou rekombinantných  $\alpha$ -synukleínových substrátov používaných v RT-QuIC testoch (Zborník\_Struc Biol and Biophys symposium, str. 31 a 37). Diskusia s odborníkmi z oblasti štruktúrálnej biológie, biofyziky a neurovied poskytla cennú spätnú väzbu, ktorá bola využitá pri ďalšej optimalizácii metodických postupov. Prezentácia výsledkov na domácich aj medzinárodných odborných podujatiach prispela k zviditeľneniu projektu, šíreniu získaných poznatkov a rozšíreniu siete odborných kontaktov. Zároveň vytvorila priestor na nadviazanie nových spoluprác a posilnenie existujúcich partnerstiev v oblasti výskumu biomarkerov neurodegeneratívnych ochorení.

Do riešenia projektu bola aktívne zapojená aj študentka Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského, Bc. Patrícia Grznárová, ktorá prezentovala získané výsledky formou postera na Študentskej vedeckej konferencii ŠVK 2026. Výsledky práce boli zároveň spracované do recenzovaného príspevku, ktorý bol publikovaný v konferenčnom zborníku, čím projekt prispel aj k výchove mladej vedeckej generácie a šíreniu získaných poznatkov medzi študentmi a začínajúcimi výskumníkmi (Zborník ŠVK, str. 171-175). Do projektu boli aktívne zapojení aj ďalší mladí vedeckí pracovníci NiÚ. PhD študent Mgr. Adam Polák spolupracoval na produkcii substrátov do RT-QuIC a spolupodieľal sa aj na jednej publikácii.

Projekt nebol počas monitorovacieho obdobia prerušený ani pozastavený. Riešenie projektu prebiehalo kontinuálne, avšak vzhľadom na oneskorené dodanie prístroja OctetR2, potrebného na testovanie substrátov, na vyššiu technickú náročnosť optimalizácie metodiky RT-QuIC a na potrebu rozsiahlej charakterizácie rekombinantných substrátov došlo k čiastočnému posunu niektorých validačných aktivít oproti pôvodnému harmonogramu. Napriek tomu boli dosiahnuté významné metodické a experimentálne výsledky, ktoré vytvorili pevný základ na pokračovanie vývoja diagnostických testov založených na amplifikácii patologických proteínových agregátov.

#### Referencie:

- [1] C.P.K. Lai, X.O. Breakefield, Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies, *Front. Physiol.* 3 (2012) 228. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00228>.
- [2] L. Zitvogel, A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, S. Amigorena, Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes, *Nat. Med.* 4 (1998) 594–600. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>.
- [3] A. Kluge, J. Bunk, E. Schaeffer, A. Drobny, W. Xiang, H. Knacke, S. Bub, W. Lückstädt, P. Arnold, R. Lucius, D. Berg, F. Zunke, Detection of neuron-derived pathological  $\alpha$ -synuclein in blood, *Brain* 145 (2022) 3058–3071. <https://doi.org/10.1093/brain/awac115>.
- [4] E. Schaeffer, A. Kluge, C. Schulte, C. Deuschle, J. Bunk, J. Welzel, W. Maetzler, D. Berg, Association of Misfolded  $\alpha$ -Synuclein Derived from Neuronal Exosomes in Blood with Parkinson's Disease Diagnosis and Duration, *J. Parkinsons. Dis.* 14 (2024) 667–679. <https://doi.org/10.3233/JPD-230390>.
- [5] A. Stundl, T. Kraus, M. Chatterjee, B. Zapke, B. Sadowski, W. Moebius, M.A. Hobert, C. Deuschle, K. Brockmann, W. Maetzler, B. Mollenhauer, A. Schneider,  $\alpha$ -Synuclein in Plasma-Derived Extracellular Vesicles Is a Potential Biomarker of Parkinson's Disease, *Mov. Disord.* 36 (2021) 2508–2518. <https://doi.org/10.1002/mds.28639>.
- [6] A.M. Bernhardt, M. Nemat, F.A. Boros, F. Hopfner, J. Levin, B. Mollenhauer, J. Winkler, I. Zerr, F. Zunke, G. Höglinger,  $\alpha$ -Synuclein Seed Amplification Assays from Blood-Based Extracellular Vesicles in Parkinson's Disease: An Evaluation of the Evidence, *Mov. Disord.* 39 (2024) 1269–1271. <https://doi.org/10.1002/mds.29923>.

## Míľníky

### **Míľník 1 Reprodukateľnosť izolácie neuronálnych extracelulárnych vezikúl z krvi** Záverečná správa

Počas tohto monitorovacieho obdobia prebehli ďalšie experimenty zamerané na optimalizáciu a zavedenie izolácie extracelulárnych vezikúl (EV) a neuronálnych extracelulárnych vezikúl (NEV) z kontrolných plazmatických vzoriek. Otestované boli viaceré kolóny na gélovú filtráciu určené na izoláciu EV (qEV20, qEV35, qEVoriginal-70) s následným imunoobohatením NEV pomocou protilátky anti-NCAM-L1. Výsledky ukázali po prvom kroku izoláciu EV vo veľkostnom rozsahu zodpovedajúcom dátam v odbornej literatúre, čo bolo potvrdené pomocou DLS a NTA analýz. Porovnanie jednotlivých izolačných prístupov ukázalo, že najvhodnejším riešením je použitie kolóny qEV35, ktorá poskytovala najnižší obsah kontaminujúcich proteínov pri zachovaní populácie častíc zodpovedajúcej extracelulárnym vezikulám. Opakovateľnosť metódy bola následne overená na nezávisle spracovaných 53 vzorkách pacientov a kontrolných vzorkách. Vo všetkých prípadoch boli získané porovnateľné veľkostné distribúcie častíc a obdobná kvalita izolátov, čo potvrdilo reprodukovateľnosť zavedeného postupu. Optimalizovaný protokol kombinujúci veľkostnú separáciu pomocou gélovej filtrácie a následné imunologické obohatenie NEV bol následne využitý pri príprave vzoriek pre nadväzujúce experimenty zamerané na optimalizáciu metodiky RT-QulC. Zavedená metodika tak vytvorila štandardizovaný základ pre ďalšie analýzy patologických foriem  $\alpha$ -synukleínu v neuronálnych extracelulárnych vezikulách.

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že bol úspešne splnený cieľ míľníka 1 – reprodukovateľná izolácia neuronálnych extracelulárnych vezikúl z krvi.

Priložené dokumenty:

Príloha 1 Príloha záverečnej správy

## **Míľník 2 Validácia $\alpha$ -syn RT-QulC testu z krvných extracelulárnych vezikúl**

Záverečná správa

V rámci projektu sme zaviedli a adaptovali metodiku RT-QulC na amplifikáciu a detekciu agregovaného  $\alpha$ -synukleínu. Testovanie bolo zahájené na rekombinantných substrátoch pripravených expresiou v bunkách *Escherichia coli* a následne purifikovaných chromatografickými metódami. Na základe hodnotenia variability substrátu (His-tagovaný versus natívny  $\alpha$ -synukleín) a optimalizácie reakčných podmienok sme nastavili experimentálne podmienky na následné testovanie vzoriek EV a NEV.

Funkčné vlastnosti pripravených proteínových substrátov boli potvrdené pomocou interakčných analýz s protilátkou Syn-211 na biosenzoroch prístroja Octet R2. Na overenie reprodukovateľnosti prípravy kľúčového komponentu RT-QulC testu sme pripravili a porovnali tri nezávislé šarže His-tagovaného  $\alpha$ -synukleínu a tri nezávislé šarže natívneho  $\alpha$ -synukleínu. Jednotlivé šarže boli charakterizované z hľadiska čistoty, biofyzikálnych vlastností a správania sa v reakcii RT-QulC. Výsledky ukázali, že napriek porovnateľnej čistote a väzbovým vlastnostiam vykazovali jednotlivé šarže rozdielnú schopnosť amplifikovať signál. Na základe komplexného vyhodnotenia bola ako optimálny substrát vybraná natívna forma  $\alpha$ -synukleínu, ktorá poskytovala najlepší pomer medzi citlivosťou detekcie a nízkou mierou spontánnej agregácie. Tým sa podarilo vytvoriť štandardizovaný experimentálny systém a identifikovať kľúčové parametre ovplyvňujúce reprodukovateľnosť metodiky.

Metodika bola následne pilotne testovaná na súbore 53 vzoriek, z ktorých boli izolované EV a NEV. Hoci sa podarilo úspešne optimalizovať prípravu substrátu, reakčné podmienky a jednotlivé kroky experimentálneho postupu, výsledky ukázali, že pri súčasnom nastavení test zatiaľ nedosahuje požadovanú úroveň citlivosti a špecificity potrebnú na spoľahlivé odlíšenie pozitívnych a negatívnych vzoriek. Získané výsledky naznačujú, že limitujúcim faktorom môže byť nízka koncentrácia patologických agregátov v izolovaných EV/NEV, pričom ďalšie zvýšenie analytickej citlivosti si pravdepodobne vyžiada výrazné zvýšenie vstupného objemu biologického materiálu.

Riešenie míľníka umožnilo identifikovať hlavné faktory ovplyvňujúce výkonnosť metodiky RT-QulC, vytvoriť štandardizovaný experimentálny postup a definovať ďalšie kroky potrebné na jej klinickú validáciu. Na základe dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že ciele míľníka 2 boli naplnené v oblasti zavedenia, optimalizácie a experimentálneho overenia metodiky  $\alpha$ -syn RT-QulC, pričom sa testovalo 53 vzoriek. Výsledkom bola tiež publikácia Labajova et al., 2026 „When Proteins Go MAD – Misfolded, Amplified, Detected: Advances in  $\alpha$ -Synuclein Pathophysiology and RT-QulC Detection“ v časopise *Molecular Neurobiology* (Q1; IF 4,3).

Výstupy:

- Publikácia Labajová et al., 2026 „When Proteins Go MAD – Misfolded, Amplified, Detected: Advances in  $\alpha$ -Synuclein Pathophysiology and RT-QulC Detection“ v časopise Molecular Neurobiology (Q1; IF 4,3).  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-025-05600-2>
- pozvaná prednáška „Využitie metódy RT-QulC v diagnostike Parkinsonovej choroby“ na konferencii „Ako veda formuje modernú kúpeľnú liečbu“, 25.–26.11.2025, Piešťany.
- Reporty Priebežná správa a Príloha k priebežnej správe, Záverečná správa a Príloha k záverečnej správe.

Priložené dokumenty:

Príloha 1 Príloha záverečnej správy

Príloha 2 Labajova et al., 2026

Príloha 3 Program\_Piestany 2025

Príloha 4 RT-QulC in diagnostics of Parkinson's disease

### **Míľnik 3 Analýza vzoriek od pacientov**

Záverečná správa

V nadväznosti na optimalizáciu izolácie EV a zavedenie metodiky RT-QulC sme pristúpili k analýze 15 vzoriek pacientov získaných v rámci klinického skúšania zameraného na hodnotenie nefarmakologických intervencií u pacientov s demenciou a miernou kognitívnou poruchou. Zo vzoriek krvnej plazmy boli izolované EV a NEV pomocou optimalizovaného protokolu, ktorý kombinuje gélovú filtráciu a imunoselekciiu. Izolované vzorky boli následne analyzované pomocou optimalizovanej metodiky  $\alpha$ -syn RT-QulC s cieľom detegovať prítomnosť patologických agregátov  $\alpha$ -synukleínu. Súčasne boli vyhodnocované parametre reakcie vrátane kinetiky amplifikácie, intenzity fluorescenčného signálu a reprodukovateľnosti medzi jednotlivými meraniami.

Výsledky ukázali, že pri aktuálne dostupnom množstve izolovaných EV/NEV a nastavených podmienkach reakcie nie je možné spoľahlivo rozlíšiť pozitívne a negatívne vzorky pacientov. Pozorované výsledky naznačujú, že koncentrácia patologických agregátov  $\alpha$ -synukleínu v izolovaných vezikulách sa pravdepodobne nachádza na hranici detekčných možností použitej metodiky. Získané dáta zároveň poukázali na potrebu ďalšej optimalizácie izolačného postupu, zvýšenia výťažku neuronálnych vezikúl a ďalšieho zvyšovania analytickej citlivosti testu RT-QulC zavedením modifikovaného substrátu.

Napriek tomu, že sa nepodarilo dosiahnuť jednoznačnú diagnostickú diskrimináciu medzi skupinami pacientov, analýza klinických vzoriek poskytla cenné informácie o limitáciách metodiky pri práci s reálnym biologickým materiálom. Získané poznatky umožnili identifikovať kritické kroky ovplyvňujúce citlivosť testu a definovať ďalšie experimentálne smerovanie potrebné na budúcu klinickú validáciu.

Na základe dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že míľnik 3 bol naplnený v rozsahu realizácie analýzy patientskych vzoriek z klinickej štúdie a experimentálneho overenia použiteľnosti metodiky na klinickom materiáli.

Výstupy:

- Report Záverečná správa a Príloha k záverečnej správe.
- Report Výročná správa NIU 2025  
[https://niu.sav.sk/Documents/NiUSAV\\_Annual\\_Report\\_2025.pdf](https://niu.sav.sk/Documents/NiUSAV_Annual_Report_2025.pdf)

Priložené dokumenty:

Príloha 1 Príloha záverečnej správy

Príloha 5 NIU\_SAV\_Annual\_Report\_2025

### **Míľnik 4 Validácia tau RT-QulC testu z krvných extracelulárných vezikúl**

Záverečná správa

V rámci Míľnika 4 sme vyvinuli a pilotne validovali metodiku Tau RT-QulC určenú na amplifikáciu a detekciu patologických agregátov proteínu Tau. Na základe analýzy publikovaných protokolov boli optimalizované podmienky prípravy substrátu, pozitívnej kontroly a samotnej amplifikačnej reakcie.

Pripravený bol rekombinantný Tau40 proteín, ktorý bol purifikovaný chromatografickými metódami a charakterizovaný z hľadiska vhodnosti pre RT-QulC experimenty. Súčasne bol pripravený agregovaný Tau seed založený na kombinácii Tau40 a dGAE fragmentu, ktorý slúžil ako pozitívna kontrola a následne boli testované rôzne parametre reakcie. Výsledky potvrdili, že navrhnutý experimentálny systém je schopný detegovať *in vitro* pripravené Tau agregáty a reprodukovateľne amplifikovať pozitívny signál. Zároveň sa však ukázalo, že citlivosť metodiky je zatiaľ obmedzená a pri prenose na biologické vzorky predstavuje významný limitujúci faktor potreba použitia detergentu Triton X-100 na uvoľnenie obsahu extracelulárnych vezikúl. Tento detergent pravdepodobne inhibuje proces amplifikácie Tau agregátov a negatívne ovplyvňuje výkonnosť testu.

Riešenie problémov umožnilo vytvoriť pilotnú verziu Tau RT-QulC metodiky, identifikovať kľúčové parametre ovplyvňujúce jej funkčnosť a definovať ďalšie kroky potrebné pre zvýšenie citlivosti a aplikáciu na klinické vzorky. Na základe dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že cieľ 4 bol splnený v rozsahu vývoja, optimalizácie a experimentálneho overenia metodiky Tau RT-QulC, otestovalo sa 50 vzoriek. Okrem plánovaných výstupov sa počas riešenia projektu podarilo dosiahnuť aj viacero výstupov nad rámec pôvodného plánu. Výsledky projektu boli aktívne diseminované prostredníctvom vedeckých konferencií, odborných publikácií a zapojenia študentov do výskumu. Tieto aktivity významne prispeli k zviditeľneniu projektu, rozšíreniu odborných spoluprác a podpore ďalšieho rozvoja metodík vyvíjaných v rámci projektu.

#### Výstupy:

- poster a publikácia „ $\alpha$ -Synukleín: od purifikácie k agregácii“ v recenzovanom zborníku Študentskej vedeckej konferencie PriF UK 2026, ISBN: 978-80-223-6286-3, str. 170-175, ktorá sa konala 29.4.2026 v Bratislave.  
[https://fns.uniba.sk/fileadmin/prif/svk/zborniky/Zbornik\\_SVK\\_PriF\\_UK\\_2026.pdf](https://fns.uniba.sk/fileadmin/prif/svk/zborniky/Zbornik_SVK_PriF_UK_2026.pdf)
- poster „A-synuclein: from purification to aggregation“ a prednáška „Substrate Matters: Screening  $\alpha$ -Synuclein Variants to Improve RT-QulC Performance in Synucleinopathies“ sme prezentovali výsledky na medzinárodnej konferencii „Structural biology and biophysics symposium“, 30.4.2026 v Bratislave. Výsledkom bola tiež publikácia v European Pharmaceutical Journal, ID: EurPharmJ-D-26-00010.  
<https://reference-global.com/article/10.2478/afpuc-2026-0007>
- Na novo podaná publikácia „Deep Plasma Proteomics Identifies a PD-Specific Systemic Proteostatic and Redox-Adaptive Shift Characterized by an IFN- $\gamma$ -Polyubiquitin-B Hub Following Combined Physical and Metabolic Stimuli“ v časopise *Antioxidans* (Q1; IF 8,2), ID: 4617494, v spolupráci s Prof. Martinom Kolísekom. Momentálne v revíznom procese, tesne pred akceptáciou/publikáciou
- Záverečná správa a Príloha k záverečnej správe.

#### Priložené dokumenty:

Príloha 1 Príloha záverečnej spravy

Príloha 6 Korencikova et al., 2026

Príloha 7 Substrate Matters

Príloha 8 Zborník\_Struc Biol and Biophys symposium

Príloha 9 SVK\_Grznarova et al., 2026

#### Výstupy projektu

##### **Výstup 1** Metóda izolácie neuronálnych extracelulárnych vezikúl

Typ a číslo monitorovacej správy: Záverečná správa

Pracovný balík NV1 – Izolácia neuro-ECV

#### Popis:

Počas realizácie projektu sme optimalizovali metodiku izolácie extracelulárnych vezikúl (EV) a neuronálnych extracelulárnych vezikúl (NEV) z krvnej plazmy. Testovali sme viaceré prístupy založené na gélovej chromatografii (qEV20, qEV35 a qEVoriginal-70) v kombinácii s imunoselekciou pomocou protilátok

proti NCAM-L1. Na základe DLS, NTA a analýzy obsahu kontaminujúcich proteínov bola ako najvhodnejšia vyhodnotená kolóna qEV35. Reprodukovateľnosť metodiky bola potvrdená na 53 kontrolných aj patientských vzorkách. Výsledkom projektu je optimalizovaný a reprodukovateľný postup izolácie NEV vhodný pre následné RT-QuIC analýzy.

Priložené dokumenty:

Príloha 1 Príloha záverečnej správy

## **Výstup 2 $\alpha$ -syn RT-QuIC test z krvných extracelulárnych vezikúl**

Typ a číslo monitorovacej správy: Záverečná správa

Pracovný balík NV2 –  $\alpha$ -syn RT-QuIC test

Popis:

Počas realizácie projektu sme zaviedli a optimalizovali metodiku RT-QuIC na amplifikáciu a detekciu agregovaného  $\alpha$ -synukleínu. Pripravili a charakterizovali sme viacero nezávislých šarží rekombinantného His-tagovaného a natívneho  $\alpha$ -synukleínu, ktoré boli následne porovnané z hľadiska ich vhodnosti ako substrátu pre RT-QuIC test. Ako najvhodnejší substrát bola identifikovaná natívna forma  $\alpha$ -synukleínu, ktorá vykazovala vysokú citlivosť pri súčasne nízkej miere spontánnej agregácie. Optimalizovaná metodika bola následne testovaná na 53 EV/NEV izolátoch z kontrolných a patientských vzoriek. Podarilo sa vytvoriť štandardizovaný experimentálny systém a identifikovať hlavné faktory ovplyvňujúce jeho citlivosť a reprodukovateľnosť.

Priložené dokumenty:

Príloha 1 Príloha záverečnej správy

Príloha 2 Labajova et al., 2026

Príloha 3 Program\_Piestany 2025

Príloha 4 RT-QuIC in diagnostics of Parkinson's disease

## **Výstup 3 Molekulová diagnostika synukleinopatie u pacientov s demenciou v klinickom skúšaní**

Typ a číslo monitorovacej správy: Záverečná správa

Pracovný balík NV3 – RT-QuIC v štúdií

Popis:

Počas realizácie projektu boli analyzované vzorky pacientov zaradených do klinického skúšania zameraného na nefarmakologické intervencie u pacientov s demenciou a miernou kognitívnou poruchou. Z krvnej plazmy boli izolované extracelulárne a neuronálne extracelulárne vezikuly, ktoré boli následne analyzované pomocou optimalizovanej metodiky  $\alpha$ -syn RT-QuIC. Získané výsledky umožnili experimentálne overiť použiteľnosť metodiky na klinickom materiáli a identifikovať hlavné limitácie ovplyvňujúce citlivosť detekcie patologických agregátov  $\alpha$ -synukleínu. Získané poznatky poskytli dôležitý základ pre ďalšiu optimalizáciu metodiky a jej budúcu klinickú validáciu.

Priložené dokumenty:

Príloha 1 Príloha záverečnej správy

Príloha 5 NiU\_SAV\_Annual\_Report\_2025

## **Výstup 4 Tau RT-QuIC pilotná verzia testu**

Typ a číslo monitorovacej správy: Záverečná správa

Pracovný balík NV4 – Tau RT-QuIC test

Popis:

Počas realizácie projektu bola vytvorená a optimalizovaná pilotná verzia metodiky Tau RT-QuIC, určená na amplifikáciu a detekciu patologických agregátov proteínu Tau. Testované boli rôzne experimentálne

podmienky a metodiku sa podarilo úspešne nastaviť na pozitívnej kontrole pripravenej z *in vitro* generovaných Tau seedov. Súčasne boli identifikované hlavné faktory limitujúce aplikáciu testu na izoláty EV/NEV z biologických vzoriek, najmä inhibičný účinok detergentu Triton X-100 na proces amplifikácie Tau agregátov. Otestovali sme 50 kontrolných a patientských vzoriek. Výsledkom projektu je pilotný experimentálny systém a metodický základ na ďalší vývoj a optimalizáciu testu Tau RT-QulC.

Priložené dokumenty:

Príloha 1 Príloha záverečnej spravy

Príloha 6 Korencikova et al., 2026

Príloha 7 Substrate Matters

Príloha 8 Zborník Struc Biol and Biophys symposium

Príloha 9 SVK\_Grznarova et al., 2026

### **Identifikácia problémov a rizík**

Počas realizácie projektu sa vyskytlo niekoľko technických a metodických problémov, ktoré však ovplyvnili tempo naplňania jednotlivých míľnikov a výstupov projektu iba mierne.

#### **1. Sporná špecifita markerov neuronálnych extracelulárnych vezikúl**

Počas riešenia projektu boli publikované práce spochybňujúce využitie markerov L1CAM a NCAM ako špecifických markerov neuronálnych extracelulárnych vezikúl. Ukázalo sa, že tieto proteíny sa môžu v biologických tekutinách vyskytovať aj vo forme voľných rozpustných proteínov. Táto skutočnosť si vyžiadala prehodnotenie pôvodne navrhnutého postupu izolácie NEV a realizáciu dodatočných optimalizačných experimentov.

Prijaté opatrenia:

- zavedenie gélovej chromatografie ako štandardného kroku pred imunoselekciou,
- porovnanie viacerých typov SEC kolón (qEV20, qEV35 a qEVoriginal-70),
- optimalizácia kombinovaného postupu SEC a imunoselektie.

#### **2. Nízka koncentrácia patologických agregátov v izolovaných EV/NEV**

Po optimalizácii izolačného postupu sa ukázalo, že koncentrácia patologických agregátov  $\alpha$ -synukleínu v izolovaných EV/NEV je pravdepodobne veľmi nízka a nachádza sa blízko detekčného limitu metodiky RT-QulC. Napriek úspešnej optimalizácii substrátu a reakčných podmienok nebolo možné spoľahlivo rozlíšiť pozitívne a negatívne klinické vzorky.

Prijaté opatrenia:

- optimalizácia výťažku EV/NEV izolácie,
- testovanie rôznych reakčných podmienok RT-QulC,
- pilotné overenie metodiky na kontrolných a patientských vzorkách,
- identifikácia kritických parametrov ovplyvňujúcich citlivosť testu.

#### **3. Variabilita rekombinantného $\alpha$ -synukleínu používaného ako substrát RT-QulC**

Významným faktorom ovplyvňujúcim reprodukovateľnosť RT-QulC testu bola variabilita medzi jednotlivými šaržami rekombinantného  $\alpha$ -synukleínu. Napriek porovnateľnej čistote a väzbovým vlastnostiam vykazovali jednotlivé šarže rozdielne správanie v amplifikačnej reakcii.

Prijaté opatrenia:

- paralelná príprava natívnych a His-tagovaných foriem  $\alpha$ -synukleínu,
- charakterizácia jednotlivých šarží pomocou SDS-PAGE, DLS a Octet R2,
- výber optimálneho substrátu WT2 pre následné experimenty,
- zavedenie štandardizovaného postupu na prípravu a validáciu substrátu.

#### **4. Technické obmedzenia pri vývoji Tau RT-QulC testu**

Počas vývoja metodiky Tau RT-QulC sa ukázalo, že detergenty potrebné na uvoľnenie obsahu extracelulárnych vezikúl môžu inhibovať amplifikáciu Tau agregátov. Táto skutočnosť obmedzila možnosť rozlíšiť pozitívne a negatívne biologické vzorky.

Prijaté opatrenia:

- testovanie rôznych reakčných podmienok,
- optimalizácia zloženia reakčnej zmesi,
- identifikácia kritických faktorov ovplyvňujúcich amplifikáciu tau agregátov.

Napriek uvedeným problémom sa podarilo splniť hlavné metodické ciele projektu: vytvoriť reprodukovateľný postup izolácie EV/NEV, zaviesť a optimalizovať metodiku  $\alpha$ -syn RT-QulC a pripraviť pilotnú verziu testu Tau RT-QulC. Súčasne boli identifikované hlavné limitácie jednotlivých metodík, ktoré budú predmetom ďalšieho výskumu a optimalizácie.

### Zhodnotenie naplnenia cieľu projektu

Hlavným cieľom projektu bolo vyvinúť a overiť metodické postupy umožňujúce izoláciu neuronálnych extracelulárnych vezikúl z krvi a vytvoriť experimentálny základ na detekciu patologických proteínových agregátov pomocou amplifikačných metód RT-QulC s perspektívou ich využitia v diagnostike neurodegeneratívnych ochorení.

Počas riešenia projektu sa podarilo optimalizovať a štandardizovať metodiku izolácie extracelulárnych vezikúl a neuronálnych extracelulárnych vezikúl z krvnej plazmy. Bola preukázaná reprodukovateľnosť izolačného postupu a identifikovaný optimálny protokol založený na kombinácii gélovej chromatografie a imunoselektie. Súčasne bola zavedená a optimalizovaná metodika  $\alpha$ -Syn RT-QulC vrátane prípravy, charakterizácie a validácie rekombinantných substrátov. Významným výsledkom projektu bolo identifikovanie variability medzi jednotlivými šaržami  $\alpha$ -synukleínu a preukázanie jej zásadného vplyvu na reprodukovateľnosť amplifikačných testov.

Metodika bola následne aplikovaná na klinické vzorky pacientov. Hoci sa nepodarilo dosiahnuť citlivosť a špecifitu potrebnú na spoľahlivú diagnostickú klasifikáciu pacientov, získané výsledky umožnili identifikovať hlavné limitácie súčasného prístupu, predovšetkým nízku koncentráciu patologických agregátov v izolovaných vezikulách a potrebu ďalšej optimalizácie analytickej citlivosti testu. V rámci projektu bol zároveň vytvorený metodický základ na vývoj testu Tau RT-QulC. Podarilo sa pripraviť pilotnú verziu metodiky, nastaviť experimentálne podmienky na pozitívnych kontrolách a identifikovať technické faktory, ktoré obmedzujú jej aplikáciu na biologické vzorky.

Významným prínosom projektu bolo aj rozšírenie a posilnenie existujúcich odborných spoluprác a nadviazanie nových partnerstiev. Spolupráca s RNDr. Martinom Kolískom, PhD. prispievala k získaniu biologických vzoriek a viedla k spoločným vedeckým publikáciám. Inicializovala sa aj spolupráca s MUDr. Christianom Terkaničom z ÚVN SNP Ružomberok zameraná na budúce klinické štúdie pacientov s neurodegeneratívnymi ochoreniami. Projekt zároveň podporil pokračovanie spolupráce partnerov združených v projekte ADDIT-CE.

Výsledky projektu boli prezentované na odborných konferenciách a workshopoch vrátane AD Workshop No. 5, Structural Biology and Biophysics Symposium a konferencie „Ako veda formuje modernú kúpeľnú liečbu“. Projekt prispel aj k výchove mladej vedeckej generácie prostredníctvom zapojenia študentky Prírodovedeckej fakulty UK a PhD študenta, ktorí sa aktívne podieľali na príprave substrátov a testov RT-QulC. Výsledky boli následne publikované v recenzovanom konferenčnom zborníku.

Priamym dopadom projektu je vytvorenie štandardizovaných metodických postupov na purifikáciu substrátov RT-QulC, izoláciu neuronálnych extracelulárnych vezikúl a zavedenie technológie RT-QulC na pracovisku prijímateľa. Projekt zároveň priniesol nové poznatky o faktoroch ovplyvňujúcich reprodukovateľnosť amplifikačných testov a o limitáciách detekcie patologických proteínových agregátov v biologických vzorkách. Tieto poznatky budú bezprostredne využité pri ďalšej optimalizácii metodiky a pri príprave nadväzujúcich výskumných projektov.

V horizonte najbližších 2–5 rokov sa očakáva ďalšie zdokonalenie metodík RT-QulC pre  $\alpha$ -synukleín a Tau, rozšírenie klinických kohort pacientov a realizácia rozsiahlejších validačných štúdií. Získané metodické postupy a vytvorené spolupráce budú využité v pokračujúcich aktivitách projektu ADDIT-CE, ako aj v ďalších projektoch zameraných na vývoj biomarkerov neurodegeneratívnych ochorení.

Dlhodobým cieľom je prispieť k vývoju citlivých a minimálne invazívnych diagnostických nástrojov, ktoré umožnia skoršiu diagnostiku synukleinopatií a tauopatií.

Projekt tak splnil svoje hlavné metodické a vývojové ciele. Získané výsledky predstavujú významný základ pre ďalší vývoj ultrasenzitívnych diagnostických metód založených na amplifikácii patologických proteínových agregátov a pre ich budúce využitie pri diagnostike neurodegeneratívnych ochorení.