

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd**

Biochemické markery Alzheimerovy demence

Bakalářská práce

Michaela Zvěřinová

Hradec Králové 2009

Vedoucí práce: PharmDr. Miloslava Netopilová, Phd.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Obsah

Úvod.....	- 4 -
1. Alzheimerova choroba	- 5 -
2. Cerebrospinální mok.....	- 7 -
2.1. Anatomie a fyziologie likvoru	- 7 -
2.2. Tvorba a cirkulace likvoru	- 8 -
2.3. Funkce likvoru	- 9 -
2.4. Odběr cerebrospinálního moku.....	- 9 -
2.5. Opatření po lumbální punkci	- 11 -
2.6. Kontraindikace lumbální punkce	- 11 -
3. Laboratorní diagnostika Alzheimerovy choroby	- 12 -
3.1. Biomarkery mozkomíšního moku	- 13 -
3.1.1. Hodnoty Abeta v likvoru.....	- 13 -
3.1.2. Koncentrace celkového tau proteinu v likvoru	- 15 -
3.1.3. Koncentrace fosforylovaného tau proteinu v likvoru	- 17 -
3.1.4. Biomarkery oxidačního stresu	- 19 -
3.1.5. Ubikvitin	- 20 -
3.2. Periferní biomarkery	- 21 -
3.2.1. Abeta peptid v plazmě.....	- 21 -
3.2.2. Formy amyloidního prekurzorového proteinu v destičkách	- 22 -
3.2.3. Sekretázy v krevních destičkách.....	- 23 -
3.2.4. Biomarkery zánětu	- 23 -
3.3. Biomarkery lipoproteinového metabolismu	- 24 -
3.3.1. Cholesterol a Alzheimerova choroba	- 24 -
3.3.2. 24S-Hydroxycholesterol	- 26 -
3.3.3. Lipoprotein (a)	- 26 -
3.3.4. Apolipoprotein E.....	- 27 -
3.3.5. Homocystein	- 28 -
Závěr	- 29 -
Zkratky.....	- 31 -
Seznam použité literatury	- 32 -

Úvod

Alzheimerova demence je v současné době velkým problémem na celém světě. Touto nemocí trpí přibližně 15 milionů lidí. U velké většiny byla nemoc diagnostikována až v poměrně pokročilém stádiu. Proto je zde stále větší snaha o ucelení informací týkajících se charakteristických znaků choroby, možnostech léčby či monitorování úspěšnosti léčby, a zejména diagnostiky.

Cílem této práce je podat základní přehled o zkoumaných biomarkrech, které by mohly být použity v časně diagnostice. K monitorování se v dnešní době využívá zejména mozkomíšní mok, jehož složení odráží veškeré děje v mozku. Vyšetření plazmy se užívá zejména díky snažšímu odběru, který tolik nezatěžuje pacienta. Lepší výsledky však poskytují biomarkery likvoru, kterým se v této práci věnuji především. Zaměřím se především na amyloidní peptid β , tau protein a biomarkery lipidového metabolismu, které se zdají být pro diagnostiku Alzheimerovy demence nejpřínosnější.

1. Alzheimerova choroba

Alzheimerova demence je pomalu se rozvíjející onemocnění s plíživým počátkem a následným poškozením krátkodobé paměti. Tato choroba reprezentuje nejčastější neurodegenerativní onemocnění na světě. Tato nemoc postihuje převážně starší 65 let. Alzheimerova demence může být také podmíněna geneticky. Asi u 10 % pacientů s rodinnou formou Alzheimerovy choroby se příznaky objevují již ve věku 40 až 50 let. Konkrétně jde o možné mutace čtyř genů, a to pro prekurzorový amyloidní protein beta (chromozom 21), pro presenilin 1 a 2 (chromozomy 14 a 1), a k tomu přistupuje protein tau, za jehož tvorbu odpovídá gen na chromozomu 17 (Šťastný, 2007).

Pro nemoc je charakteristický rozsáhlý zánik neuronů i jejich synaptických spojení, provázený postupnou ztrátou paměti, vyjadřovacích schopností a poruchou osobnosti. Výsledkem je demence, která většinou po 5 až 10 letech končí pacientovou smrtí. Uvnitř neuronů v pacientově mozku jsou mikroskopická klubíčka, tvořená chybně svinutým a nadměrně fosforylovaným proteinem tau. Mimo neurony se současně ukládají polymery amyloidních peptidů β (Abeta) se zbytky výběžků nervových buněk, přičemž vznikají amyloidní plaky. Klesá výdej některých neurotransmiterů, především acetylcholinu, z nervových zakončení v mozkové kůře a limbickém systému. Postupně se zhoršuje schopnost učení, slábne paměť. Poškozené neurony, především v některých korových oblastech a podkorových strukturách, zanikají (Šťastný, 2007).

Velká pozornost se tedy věnuje odbourávání prekurzorového amyloidového proteinu beta, které vyvolá nadprodukcii amyloidního peptidu beta, a následně i tvorbu senilních plaků. Abeta je produkován a sekretován v lidských buňkách jako výsledek rozštěpení amyloidogenního prekurzorového proteinu (APP). APP patří do transmembránové rodiny glykoproteinů a může být štěpen pomocí α , β nebo γ sekretáz. Výsledkem štěpení pomocí β a γ sekretáz jsou různě dlouhé Abeta peptidy. Tyto se mohou samostatně složit do 7 – 10 nm dlouhé proteinové fibrily. Amyloidní fibrily opět tvoří chuchvalce o průměru od deseti do několika stovek μm a vytváří senilní plaky (obr.1). Senilní drúzy však nejsou specifickým znakem pro Alzheimerovu chorobu, můžeme je nalézt také v mozku starších osob, které tímto onemocněním netrpí (Crouch, 2008).

Další látkou, která má vztah k ukládání amyloidových hmot, je apolipoprotein E4

odpovědný za transport cholesterolu. Proto pacienti trpící Alzheimerovou chorobou mívají často vyšší hladinu cholesterolu. Léky ze skupiny statinů, které snižují množství cholesterolu v krvi, zároveň brzdí hromadění amyloidních hmot v mozku (Šťastný, 2007).

U dědičné formy Alzheimerovy choroby byly zjištěny mutace, které vedou ke zvýšené produkci A β 42. K mutacím dochází na APP v oblasti přilehlé k místům, která jsou za normálních okolností štěpena sekretázami. Současně dochází také ke změně aktivity sekretáz, které jsou schopny naštěpit postižené oblasti. Mutace APP nakonec způsobí značný vzrůst produkce A β 42 ve srovnání s A β 40. Popsané změny pak významně přispívají ke vzniku Alzheimerovy demence, neboť A β 42 je více toxický a spíše se bude tvořit amyloidní fibrily než A β 40 (Crouch a kol., 2008).

Dalším charakteristickým znakem Alzheimerovy choroby je rozvoj tautopatií. Tautopatie jsou způsobeny změnou v metabolismu tau proteinu. Tento protein je součástí neuronů, především jejich axonů a podílí se na anterográdním axonálním transportu. V rámci Alzheimerovy choroby může docházet ke změně v množství tau proteinu a k posttranslačním modifikacím, zejména ke změně fosforylace. Dále dochází k odchylce v agregaci a následnému vzniku neurofibrilárních změtí (Hernández, 2007).

Degenerativní proces obvykle začíná o 20 – 30 let dříve než se objeví klinické počátky Alzheimerovy. Během tohoto preklinického období, které se označuje také jako mírná porucha paměti (z angličtiny mild cognitive impairment), se zvětšuje množství senilních plaků a dochází k poškození krátkodobé paměti (v hipokampu) (Borroni a kol., 2006).

Alzheimerova choroba bývá diagnostikována až tehdy, pokud se u pacienta objeví náznaky začínající demence. Symptomy tedy musí být natolik závažné, aby se projevil v běžném životě. V současné době je čím dál vyšší informovanost veřejnosti o nemoci a možnostech léčby, což vede k tomu, že pacienti vyhledávají lékařskou pomoc již v časných stádiích onemocnění (Borroni a kol., 2006).

Alzheimerova demence se stává hlavním zdravotním problémem v západním světě. V dnešní době trpí touto chorobou přibližně 15 milionů nemocných na celém světě. Do budoucna se počítá se zvýšením počtu případů s Alzheimerovou chorobou až na 20 – 30 milionů (Lonneborg a kol., 2008).

2. Cerebrospinální mok

2.1. Anatomie a fyziologie likvoru

Mozkomíšní mok je lehce alkalická tekutina, jejíž hustota je 1006 – 1009 g/m³. Jedná se o tekutinu chudou na buňky, hyponkotickou a izosmolární. Iontové složení likvoru je stálé, mění se velmi málo. V mozkomíšním moku jsou ve vyšší koncentraci než v plazmě ionty Mg²⁺ a Cl⁻. V nižších koncentracích jsou všechny ostatní anorganické látky, tedy Na⁺, K⁺, Ca²⁺. Hladina cukrů tvoří asi 80 % plazmatických hodnot, celková bílkovina je asi 200x nižší v lumbálním moku. Hlavní složkou likvoru je však voda, která zaujímá 99 % (Zima, 2007).

Likvor je za normálních okolností čirá a bezbarvá tekutina. Ke změně barvy dochází u hnisavého zánětu (žlutá – žlutozelená barva), při obstrukci (žlutá barva) a při krvácení. Příměs krve způsobuje narůžovělé až červené zabarvení, takový likvor označujeme jako erytrochromní. Bilirubin způsobuje kanárkově žluté zabarvení a mok potom označujeme jako xantochromní. Intenzita zákalu je úměrná počtu leukocytů, silné zákalý jsou častým nálezem u bakteriální meningitidy (Zima, 2007).

Likvor vyplňuje mozkové komory a subarachnoidální prostory mozku a míchy. Likvorové prostory lze rozlišit na makroskopické, které se dále člení na intracerebrální (intraventrikulární) a extracerebrální – (subarachnoideální), a intersticiální. Intracerebrální makroskopický likvorový prostor je tvořen dvěma postranními komorami, III. komorou, mokovodem, IV. komorou a spinálním centrálním kanálkem. Objem těchto prostorů je za fyziologických podmínek asi 20 až 30 mililitrů. Tyto prostory jsou vystlány ependymem, což je nízký cylindrický epitel, který přechází na kubický epitel nad plexus chorioideus. Jednotlivé epiteliální buňky chorioidálních plexů jsou na povrchu opatřeny mikrokly a ciliemi, což napomáhá cirkulaci moku. Intersticiální likvorový prostor je tvořen labyrintem intracelulárních prostorů astroglie. Od vaskulárního systému je oddělen nepropustnou bariérou, tvořenou celulární dvouvrstvou specializovaného kapilárního endotelu. Touto strukturou je omezována

výměna molekul větších než 20 nm mezi nervovou tkání a intersticiální tekutinou. Toto uspořádání vytváří hematolivorovou bariéru (Tichý, 1997).

Mezi krví, likvorem a mozkiem se uskutečňuje stálá výměna látek ovlivněná existencí hematoencefalické bariéry. Bariérové mechanismy jsou mechanické pomocí těsného spojení endotelu kapilár, bazální membrány a gliálních pseudopodií, a mechanismy enzymatické. Hematoencefalická bariéra umožňuje selektivní průnik látek oběma nebo jen jedním směrem. Transport přes bariéru je závislý na koncentračním gradientu, molekulové hmotnosti, náboji a liposolubilitě látek nebo je ovlivněn přítomností specifických přenašečů (Tichý, 1997).

2.2. Tvorba a cirkulace likvoru

Více než polovina likvoru je tvořena sekrecí chorioidální a extrachorioidální. Zbýlá část vzniká ultrafiltrací plazmy. O intenzitě sekrece likvoru v plexech rozhoduje sodno - draselná pumpa, která je řízena $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ -ázou. Tato pumpa tlačí sodné ionty do likvoru a draselné do buněk. Na sekreci likvoru má dále vliv také karboanhydráza, která reguluje hydrataci CO_2 na anion uhličitany a jeho přesun do moku (Tichý, 1997).

Cirkulace moku začíná v intersticiálních prostorech, které drénují mozkovou a míšňí tkáň přes ependymální a piální povrch do makroskopických prostor. Z postranních mozkových komor likvor protéká přes foramen Monroi do III. komory, dále Sylviovým kanálkem do IV. komory a do centrálního kanálku míšňího. Ze IV. komory mok pokračuje párovými otvory (foramina Luschkae) do mostomozečkových koutů a přes foramen Mogendi do velké cerebelomedulární cisterny. Přítomnost tekutiny tuto část mozku rozširuje, čímž dochází k tisknutí vnějšního listu arachnoidey k zevní tvrdé pleně (Tichý, 1997).

Část moku potom pokračuje kolem míchy, další část napřed obtéká mozkový kmen a potom vzestupuje nad mozečkové hemisféry. Cirkulace končí resorpcí pomocí arachnoidálních klků v sinusech durae matris a Pacchiový granule. Resorpce je rovněž uskutečňována lymfatickým systémem, který komunikuje se subarachnoidálními

prostory perineurální cestou kolem spinálních nervů a hlavových nervů I., II., VIII. Resorpce je založena na nasávání a vypouštění tekutiny, kdy mezi likvorovým a venózním tlakem musí být potřebný gradient. Tyto veličiny se mohou měnit s polohou těla, rozhodující ale je, aby tlakový rozdíl byl nejméně 0,6 kPa (Zima, 2007).

Každou minutu dojde k vytvoření asi 0,3 – 0,4 ml likvoru, takže denní produkce dosahuje asi 430 – 580 ml. Celkové množství mozkomíšního moku se pohybuje od 120 do 180 ml, u kojenců od 40 do 60 ml. Největší objem, asi 100 ml, se nachází na bazi a nad konvexitami, komorový systém obsahuje 25 ml. Velmi variabilní je množství moku v míšním durálním vaku. DiChiro technikou značeného albuminu prokázal velmi pomalou cirkulaci moku ve spinálním durálním vaku. Na pohybu likvoru ve spinálních prostorech působí převážné pohyb a poloha těla, dýchací pohyby, arteriální pulzace a difúze látek. S tím souvisí i klinická zkušenost, že příměs krve v likvoru po malém subarachnoideálním krvácení lze prokázat až za několik hodin (Zima, 2007).

2.3. Funkce likvoru

Likvor obklopuje jako vodní polštář mozek a míchu ze všech stran a chrání je před otřesy, dále slouží k vyrovnávání tlakových poměrů nitrolebních a nitropátečních spolu s venózním systémem. Mok také plní funkci ochrannou a regulační při změnách teploty a atmosférického tlaku, účastní se na metabolismu neuronů, na odstraňování produktů katabolismu a na imunologických procesech (Zima, 2007).

2.4. Odběr cerebrospinálního moku

Likvor se odebírá při podezření na následující choroby

- míšní onemocnění
- zánětlivá onemocnění

- zánětlivě – autoimunitní demyelinizační onemocnění
- systémová autoimunitní onemocnění
- náhlé cévní mozkové příhody
- degenerativní onemocnění
- nádorová onemocnění

Patologický nález se může vyskytovat také u epilepsie, psychiatrických onemocnění, neuralgie trigeminu nebo u sekundárního postižení centrální nervové soustavy, jako je diabetes mellitus, hypotyreóza, jaterní a ledvinové selhání, alkoholismus a další (Racek, 2006).

Mozkomíšni mok se nejčastěji získává lumbální punkcí. Dalšími způsoby jsou punkce subokcipitální a laterocervikální, v neurochirurgickém prostředí také punkce postranní komory mozkové, tzv. ventrikulární. K vyšetření se odebírá 10 – 15 ml likvoru, tak aby se normalizoval likvorový tlak. Mok se odebírá minimálně do tří sterilních zkumavek, na jednu zkumavku připadá obvykle 30 kapek. K punkci se používá jehla s mandrémem u sedícího nebo ležícího pacienta. V poslední době se často používají také jehly atraumatické, které minimalizují riziko kontaminace moku krví a které snižují frekvenci výskytu postpunkčních obtíží (Tichý, 1997).

Lumbální punkce se provádí vpichem do subarachnoidálního prostoru durálního vaku mezi trny dolních bederních obratlů, kde již mícha není a probíhají zde jen kořeny. Hloubka punkce je u dospělých 4 – 8 cm, u dětí asi 2 cm (Zima, 2007).

Ke zjištění tlaku likvoru se používá Claudův manometr. Ke zjištění průchodnosti páteřního kanálku se využívá Queckenstedtova zkouška, při které stlačením krčních žil dojde k venostáze s následným zvýšením intrakraniálního tlaku, který se přenáší do lumbální oblasti. Stookyeova zkouška je podobná, provádí se stlačením břicha pacienta, tím dojde ke zvýšení jak žilního tak likvorového tlaku. Likvorový tlak vleže změřený během lumbální punkce, se pohybuje mezi 70 - 200 mm vodního sloupce a závisí na novotvorbě moku, jeho recirkulaci a resorpci, zejména však na nitrohruďním a nitrožilním tlaku. Likvorový tlak vsedě je nejméně dvojnásobný (Zima, 2007).

Dříve byla hojně prováděna také subokcipitální punkce, při které se likvor získával nábodnutím cisterna magna. Od tohoto způsobu odběru se ale v dnešní době upustilo, pro riziko nábodnutí vertebrální tepny při jejím anomálním průběhu (Zima, 2007).

Laterocervikální punkce se používá v neuroradiologii ke krční perimyelografii. Perimyelografie je zobrazovací metoda, která využívá rentgenového záření pro

zobrazení obsahu páteřního kanálu při podezření na jeho onemocnění. Aby mohl být zobrazen obsah páteřního kanálu, je nutné do něj nejprve vstříknout kontrastní látku, což se provádí právě pomocí laterocervikální punkce (Zima, 2007).

2.5. Opatření po lumbální punkci

Po lumbální punkci zůstává pacient 1 – 2 hodiny ležet na břiše a potom ještě 24 hodin ve vodorovné poloze. Díky těmto opatřením je zabráněno vzniku postpunkčních obtíží, které jsou zřejmě způsobeny likvorovou hypotenzí, jejíž příčinou je prosakování moku do podkoží otvůrkem vyříznutým odběrovou jehlou v dura mater a arachnoidee. Mok proto odtéká rychleji než se stačí obnovovat a dochází k tomu, že mozek není dostatečně nadlehčován a naráží na lebku. Dochází k postpunkčním obtížím, ke kterým řadíme zejména bolesti hlavy, nauzeu, zvracení. Otvůrek v dura mater je možno „zalepit“ fibrinovým lepidlem nebo plnou krví pacienta.

Po subokcipitální punkci nedochází k postpunkčním obtížím, nejsou tedy nutná žádná preventivní opatření (Zima, 2007).

2.6. Kontraindikace lumbální punkce

Odběr mozkomíšního moku nelze provádět u všech pacientů. Absolutní kontraindikací punkce je nitrolební hypertenze s projevy měštnání na očním pozadí. Každému odběru by proto mělo předcházet oční vyšetření. Relativní kontraindikací jsou expanze v komorovém systému, hrozba edému oblongáty, infekční projevy na kůži a podkoží v místě vpichu.

Při lumbální punkci může docházet k zavlečení infekce místem vpichu aerosolem tvořeným slinami a sekrety z úst a nosu. Sekrety a sliny mohou způsobit degradaci likvorových bílkovin. Proto se doporučuje při každém odběru používat obličejovou roušku, čímž se zamezí kontaminaci (Zima, 2007).

3. Laboratorní diagnostika Alzheimerovy choroby

Diagnostikovat Alzheimerovu demenci lze v dnešní době kombinací vyšetření neurologického a psychiatrického a do popředí zájmu se dostává vyšetření laboratorních markerů. Velmi brzy lze pomocí neuropsychologických testů objektivně popsat poruchu paměti (Blennow a kol., 2006).

V současné době se odborníci stále více věnují stanovení biomarkerů preklinické fáze nemoci (tzv. mírná porucha paměti) kvůli velkému riziku přechodu v Alzheimerovu chorobu. Mírná porucha paměti je definována jako mírné poškození paměti, které je ale významnější než by se čekalo pro individuální věk či vzdělání, ale nezasahuje zatím vážněji do běžného života. Pacient odpovídající této definici má vyšší náchylnost k rozvoji Alzheimerovy choroby během tří až pěti let. Data nashromážděná v posledních několika letech ukazují, že některé biologické indikátory Alzheimerovy choroby mohou být užity k odlišení pacientů s mírnou poruchou paměti, u kterých je riziko vzniku tohoto onemocnění výrazné, od ostatních.

Je snaha o identifikaci neuropatologických, biochemických i genetických markerů zejména proto, aby byla nemoc diagnostikována v časném stádiu. Ideální biomarkery by měly mít přímou souvislost s primárním mechanismem nemoci nebo by alespoň měly být nepřímě spjaty s procesem onemocnění. Pomocí těchto ideálních biomarkerů by potom mohla být Alzheimerova choroba diagnostikována v časném stádiu nemoci, dříve než se objeví symptomy v neuropsychologickém testu, a dříve než je zjištěna degenerace pomocí zobrazovacích metod. V současné době jsou hledány biomarkery v různých periferních tkáních a buňkách jako jsou erytrocyty, lymfocyty, vlasy, moč či kůže (Borroni a kol., 2006).

Vybrané biomarkery mohou být užity v různých klinických oblastech a mohou být rozděleny do tří kategorií:

- 1) diagnostické biomarkery pro časnou klinickou nebo preklinickou diagnostiku
- 2) klasifikace biomarkerů k rozlišení mezi podtypy Alzheimerovy demence s podobným klinickým průběhem, ale s odlišnou odpovědí na léčbu
- 3) prognostické biomarkery pro předpověď průběhu nemoci (Lönneborg, 2008).

I přes identifikaci biomarkerů, které poskytují slibné výsledky, dochází k překrývání hodnot mezi pacienty s Alzheimerovou chorobou, osobami s jinými typy

demence a zdravými jedinci. V poslední době se pozornost obrací zejména na studium vybraných periferních markerů a markerů v mozkomíšním moku (Borroni a kol., 2006).

3.1. Biomarkery mozkomíšního moku

Mozkomíšní mok je v přímém kontaktu s extracelulárním prostorem mozku a tudíž všechny biochemické změny v mozku se odráží také v mozkomíšní tekutině. Jako biomarkery pro důkaz Alzheimerovy choroby mohou být použity proteiny či molekuly, které odráží patologické procesy v mozku. Dosud byly v likvoru nalezeny tři nejdůležitější markery, jsou jimi izoforma β -amyloidního peptidu (Abeta 42), celkový τ -protein (total tau) a různé izotopy fosforylovaného τ -proteinu (p-tau). Dále jsou také sledovány biomarkery oxidačního stresu (Borroni a kol., 2006).

3.1.1 Hodnoty Abeta v likvoru

Abeta je peptid složený z 39 – 43 aminokyselin. Vniká rozštěpením amyloidogenního prekurzorového proteinu (APP). APP je citlivý k proteolýze, která probíhá pomocí specifických proteáz α , β a γ sekretáz. β -sekretázy štěpí APP na β APP a C99, pomocí γ -sekretázy je C99 dále rozštěpen až na Abeta peptid. γ -sekretáza se skládá ze 4 komponent: presenilin-1, nicastrin, APH-1 a presenilin-2. Tímto procesem je produkováno několik forem APP jako jsou Abeta 39, 40 či 42. APP je důležitý nejen pro tvorbu Abeta, ale také pro jeho degradaci (Crouch a kol. 2008).

Tímto mechanismem mohou vznikat Abeta peptidy nerozpustné s vysokou molekulovou hmotností nebo naopak rozpustné s nízkou molekulovou hmotností. Dříve se předpokládalo, že toxicky působí pouze nerozpustné peptidy, protože se v senilních placích nacházely ve velkém množství. V současné době mnoho studií popisuje toxický vliv rozpustných Abeta peptidů, zatímco nerozpustné peptidy představují konečné produkty nemoci.

Po naštěpení APP dochází k interakci Abeta peptidů s ostatními Abeta molekulami a k tvorbě oligomerů a rozpustných agregátů. Tímto seskupením v oligomery se zvyšuje asi 40 krát toxicita vůči neuronům. Pokračující amyloidogeneze zvyšuje množství nerozpustných Abeta fibril o vysoké molekulové hmotnosti, které jsou přítomny v mozku pacientů s Alzheimerovou demencí. Faktory ovlivňující oligomeraci Abeta v roztocích jsou iontová síla, pH, teplota a koncentrace Abeta. Kritickým momentem vzniku Alzheimerovy demence je pak akumulace Abeta uvnitř postižené oblasti mozku a následný pokles koncentrace Abeta

Mnoho studií popisuje rozpustné Abeta oligomery s výraznou schopností tvorby neurodegenerativních změn v mozku pacientů s Alzheimerovou demencí. Příkladem může být tzv. A β -odvozená difuzivní liganda (ADDLs). ADDLs byla popsána jako malý difuzní A β oligomer s molekulovou hmotností 17 – 42 kDa. ADDLs mění morfologii neuronů a snižuje na neuronech množství receptorů potřebných pro správnou funkci paměti.

Bateman a kolektiv testovali rychlost obratu Abeta v likvoru u zdravého muže a ženy za použití radioaktivně označeného leucinu, který se vázal na Abeta. Následně odebrali likvor a analyzovali hodnoty značeného Abeta. Nalezli, že syntéza Abeta v mozku zdravého jedince je minimální a že pomocí fyziologických mechanismů je bráněno jeho akumulaci.

K produkci Abeta peptidů tedy dochází i v mozku zdravých jedinců, avšak díky mechanismům, které brání jejich ukládání, nedochází ke vzniku senilních plaků. V současné době bylo popsáno velké množství proteináz, které se podílí na degradaci Abeta peptidu. Nejvíce studované jsou metalloproteinázy. Je známo kolem 20 typů metalloproteináz, z nichž nejprozkoumanější je metalloproteináza 9. Tento enzym je syntetizován astrocyty, které obklopují senilní plaky, a dokáže rozštěpit vznikající peptidy Abeta 40. Abeta může být také degradován pomocí inzulin degradačního enzymu, neprilysinu a dalších mechanismů (Crouch a kol., 2008).

V současné době bylo prozkoumáno několik metod zaměřujících se na měření koncentrace Abeta 42, který je, jak je uvedeno v kap. 1, více toxický a amyloidogenní než Abeta 40, v mozkomíšním moku. Nejprínosnější je metoda založená na použití monoklonálních protilátek pro C-konec Abeta 42. Většina studií se shoduje v nálezů zřetelného poklesu v koncentraci Abeta 42 a současně vzestupu koncentrace Abeta 40 u pacientů s Alzheimerovou chorobou, protože veškerý Abeta 42 je uložen v senilních drúzách. Bylo prostudováno přibližně 700 pacientů trpících Alzheimerovou demencí

a okolo 450 zdravých jedinců. U pacientů trpících Alzheimerovou demencí byl prokázán pokles v koncentraci Abeta 42 až o 50 %. Ve srovnání s kontrolami klesla koncentrace A β pod 500 pg/ml. U pacientů trpících Alzheimerovou demencí nebyl zaznamenán pokles v koncentraci Abeta 40, významný je však pokles podílu Abeta 42/Abeta 40, který může být použit v diagnostice Alzheimerovy choroby (Markesteiner, 2008).

Na druhé straně nám měření koncentrace Abeta 42 v mozkomíšním moku neumožňuje rozlišovat mezi pacienty s Alzheimerovou demencí a pacienty s jinými typy demence. Nízké hodnoty jsou nalezeny také u pacientů s vaskulární nebo fronto-temporální demencí, Creutzfeld–Jakobovou chorobou či amyotrofickou laterální sklerózou. Významný pokles Abeta 42 byl nedávno popsán také u těžkého traumatického poškození mozku. Snížené hodnoty Abeta peptidu byly nalezeny také u časně formy Alzheimerovy demence a v případech s mírných poškozením paměti, což může napomoci v diagnostice časného stádia Alzheimerovy demence.

Z těchto poznatků tedy vyplývá, že nízké koncentrace v mozkomíšním moku nejsou způsobeny pouze ukládáním Abeta 42 v senilních drúzách, ale také axonální degenerací či jeho zachycením v zúženém intersticiu (Borroni a kol., 2006).

3.1.2. Koncentrace celkového tau proteinu v likvoru

Tau je multifunkční mikrotubulární protein, který je odpovědný za vytvoření a stabilizaci mikrotubulů proti dynamické nestabilitě. Vazba tau proteinu ke struktuře mikrotubulů je zprostředkována pomocí tzv. microtubule – binding domains (MBDs). Tyto domény se skládají ze tří až čtyř opakujících se sekvencí umístěných na C – konci tau molekuly. Tau protein dále obsahuje oblasti bohaté na prolin, jejichž fosforylace ovlivňuje schopnost vazby tau k mikrotubulům. V lidském mozku se rozlišuje šest izoform. Jednotlivé izoformy se liší v počtu aminokyselin od 352 do 441 a každá izoforma má více než 21 fosforylovaných míst (Hernández a kol., 2007).

Tau se za fyziologických podmínek nalézá v axonech neuronů, v cytoskeletonu a v intracelulárním transportním systému. Hladina celkového tau v likvoru ukazuje na zánik neuronů, neboť tau je intracelulární protein a je při lýze neuronů vyplaven do

cerebrospinální tekutiny (Aluise a kol., 2008).

Před 20 lety bylo objeveno, že tau je hlavní součástí párových helikálních filament. Párová helikální vlákna jsou bohatá na fosforylovaný protein, který je hyperfosforylovanou formou tau. Abnormální fosfotau polymery se objevují ve spojení s ostatními neurologickými chorobami jako je Pickova choroba, frontotemporální demence, kortikobazální degenerace a tak dále. Tato onemocnění obecně označujeme pojmem tautopatie (Hernandéz a kol., 2007).

Od roku 1993 je koncentrace tau proteinu intenzivně zkoumána pomocí ELISA metod, které jsou založené na monoklonálních protilátkách detekujících všechny izoformy tau bez ohledu na stupeň fosforylace. Jako první popsal vyšší hodnoty t-tau u pacientů s Alzheimerovou chorobou Vandermeeren. Tyto počáteční výsledky byly potvrzeny mnoha dalšími studii. Do celkem 40 studií bylo zahrnuto přibližně 2200 pacientů s Alzheimerovou demencí a 1300 kontrol a byl prokázán vzrůst o přibližně 300 % v koncentraci tau v likvoru u pacientů s Alzheimerovou demencí. V dnešní době je koncentrace tau proteinu intenzivně sledována u více než 2000 pacientů s Alzheimerovou demencí a u 1000 zdravých jedinců (Formichi a kol., 2006).

Hladina celkového tau v mozkomíšním moku zdravé kontroly vzrůstá s věkem: <300 pg/ml (21 – 50 let), <450 pg/ml (51 – 70 let) a < 500 pg/ml (>71 let). Hladiny celkového tau proteinu významně stoupají u pacientů s Alzheimerovou demencí (> 500 pg/ml). Zajímavá se zdá být koncentrace tau u pacientů trpících Creutzfeld – Jakobovou demencí, hodnoty celkového tau stoupají nad 1200 pg/ml (Marksteiner, 2008).

Měření koncentrací celkového tau proteinu by mohlo být dobrým markerem pro diagnostiku Alzheimerovy choroby. Citlivost měření v tomto případě je 80 % a specifita 89 %. Je zde však omezení spočívající v nálezů zvýšených hodnot u ostatních typů demence. Zejména u vaskulární demence byly nalezeny vysoké hodnoty tau nebo u Creutzfeld–Jakobovy choroby. Na druhé straně je koncentrace tau v normě nebo jen zřídka zvýšená u alkoholismu, psychiatrických poruch, Parkinsonovy choroby. Významné je měření t-tau u mírné poruchy paměti. Byla prokázána zvýšená koncentrace u osob trpících mírnou poruchou paměti, která se později vyvinula v Alzheimerovu chorobu. Měření koncentrace t-tau může tedy napomoci při předpovědi rozvoje Alzheimerovy demence u jedinců trpících mírným poškozením paměti (Formichi a kol., 2006).

V poslední době je kvůli vyšší přesnosti tendence kombinovat stanovení

celkového tau a Abeta 42. Bylo provedeno několik testů, díky kterým se zjistilo, že kombinované analýzy těchto biomarkerů jsou citlivější pro rozlišení Alzheimerovy choroby od ostatních typů demence (Borronia kol., 2006).

3.1.3. Koncentrace fosforylovaného tau proteinu v likvoru

Tau protein podléhá během své syntézy četným potranslačním modifikacím, které zahrnují fosforylaci, glykosylaci, ubikvitinaci, deaminaci, oxidaci a další. Nejsledovanější je v dnešní době fosforylace na serinu a threoninu. Konečným produktem potranslačních mechanismů je fosfoprotein, který obsahuje 79 fosforylovaných míst na nejdelší izoformě vyskytující se v centrálním nervovém systému. Fosforylace tau je regulována rovnováhou mezi kinázami, cyklin dependentní kinázou 5 a kinázou glykogensyntetázy-3 β (GSK-3 β), a fosfatázami. V posledních letech byl popsán nový způsob fosforylace tau. Tato je založena na přítomnosti tau-tubulinkinázy, která nejen že modifikuje zbytky tau proteinu, ale usnadňuje také jeho agregaci (Hernandéza kol., 2007).

Defosforylace tau proteinu podporuje rozsáhlou mikrotubulární polymerizaci, zatímco fosforylace snižuje schopnost této polymerace. V mozku zdravého člověka je tau protein mírně fosforylován a rovnováha mezi fosforylací a defosforylací tvoří cytoskeletární stabilitu. Nadměrná fosforylace brání seskupení tau proteinu v mikrotubuly, odděluje je od mikrotubul a přerušuje axonální transport (Borronia kol., 2006).

Tau fosforylace je regulována pomocí ApoE ϵ 4 izoformy. ApoE stimuluje fosfatidylinositolovou 3-kinázu a následně GSK-3 β . Bylo pospáno, že agregace Abeta navozuje fosforylaci tau a také, že GSK-3 β je nezbytný pro neurotoxické působení Abeta. V konečném důsledku dochází k agregaci Abeta, usnadnění hyperfosforylace tau, která brání seskupení tau proteinu v mikrotubuly, odděluje je od mikrotubul a přerušuje axonální transport. Následně dochází k formování párových helikálních filament a později k agregaci do neurofibrilárních změtí (NFT). NFT jsou pevné vláknité sítě nalézané hlavně v hippocampu či kůře (obr. 1) (Hernandéz a kol., 2007).

V poslední době bylo objeveno, že normální tau je v lidském mozku modifikován

O-glykosylací pomocí N-acetylglukosaminu, který snižuje fosforylaci tau proteinu. Při nedostatečném přívodu glukózy do mozku se snižuje O-glykosylace a dochází k hyperfosforylaci (Formichi a kol., 2006).

Pro stanovení koncentrace p-tau byly vyvinuty některé ELISA metody. Tyto metody využívají monoklonální protilátky specifické pro fosforylované epitopy tau proteinu.

Tau protein je fosforylován na :

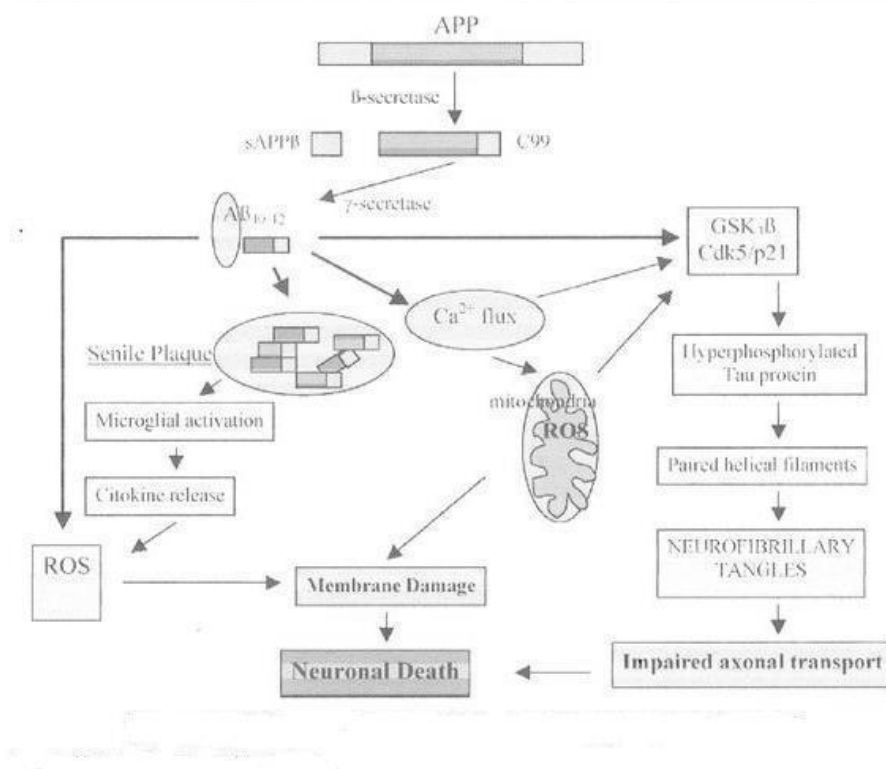
- threoninu 231
- serinu 199
- serinu 396
- threoninu 181
- serinu 404

Všech pět ELISA metod ukazovalo na vysoké koncentrace u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou. Tato zkouška je specifitější pro rozlišení pacientů s Alzheimerovou demencí od pacientů s jinými typy demence, než stanovení celkového tau proteinu, neboť vysoké hladiny p-tau byly nalezeny v likrovu pouze pacientů s Alzheimerovou demencí.

Fosforylovaný tau by mohl být také použit k rozlišení pacientů s mírnou poruchou paměti, u kterých je vysoké riziko přechodu v Alzheimerovu demenci, od pacientů, u kterých se mírná porucha paměti v Alzheimerovu chorobu nevyvine (Lonneborg, 2008).

Pro diagnostiku Alzheimerovy demence má význam především měření hladiny tau fosforylovaného v pozici 181. Fosfo-tau-181 je u Alzheimerovy choroby významně zvýšený (> 50 pg/ml), takto vysoké koncentrace nalézáme také u mírné poruchy paměti (Marksteiner, 2008).

Vysokou diagnostickou hodnotu pro odlišení Alzheimerovy demence od ostatních typů demence má kombinace p-tau a Abeta 42. Citlivost a specifita byla mnohem vyšší než u stanovení koncentrace t-tau, p-tau nebo kombinace t-tau a Abeta 42 (Formichi a kol., 2006).



obr.1 Cytotoxické působení Abeta a tau v patologii Alzheimerovy demence (Formichi a kol., 2006).

3.1.4. Biomarkery oxidačního stresu

Kromě přítomnosti senilních plaků a neurofibrilárních změtí se v mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou nachází také ve značném množství kyslíkové radikály. V důsledku oxidace nukleových kyselin a redukce aktivity antioxidačních enzymů vzniká oxidační stres a uvolňují se kyslíkové radikály. Zmíněné látky mohou být použity jako biomarkery pro diagnostiku Alzheimerovy choroby.

Schopnost přímo dokázat tento mechanismus je však poměrně složitá. Většina analytických metod využívaných pro vyšetřování oxidačního stresu se ukázala být nespolehlivá a navíc byla velká část studií provedena post mortem u pokročilého stádia nemoci, takže není dodnes zjištěné, zda se oxidační stres objevuje už v časném stadiu nemoci.

Volné radikály a polynenasycené mastné kyseliny v modifikovaných formách mohou být měřeny v mozkomíšním moku jako markery oxidačního stresu. F2-isoprostany, jako jedna skupina lipidových peroxidázových produktů tvořená

z arachidonové kyseliny, byly zvýšeny v časném stádiu Alzheimerovy choroby. Tento marker tedy může napomoci ve stanovení antioxidační experimentální terapie a v laboratorní diagnostice preklinické Alzheimerovy choroby (Borroni a kol., 2006).

3.1.5. Ubikvitin

Ubikvitin je malý peptid vyskytující se u všech eukaryotických organismů. Ubikvitin je zodpovědný především za značení proteinů určených k proteolýze (internet 1, 2008).

Ubikvitin je nezbytný pro označení tau proteinu, který následně podlehně degradaci v proteasomu. Ke značení tau proteinu dochází až po jeho fosforylaci, která je nezbytná pro navázání ubikvitinu. U pacientů s Alzheimerovou chorobou bylo nalezeno, že párová helikální vlákna, která jsou tvořena hyperfosforylovaným tau, obsahují tau protein značený ubikvitinem. Dále bylo pomocí tandemové hmotnostní spektroskopie prokázáno, že tau nalézající se v párových helikálních filamentech je značený na lysinu 254, 311 a 353. Nakonec bylo také ukázáno na snížení nebo úplnou inhibici aktivity proteasomu. Tato fakta byla zjištěna na základě použití protilátek proti ubikvitinu a proteasomu (Hernández a kol., 2007).

Pomocí metody SELDI-TOF-MS byl ubikvitin identifikován jako jeden z 30 proteinů, jejichž koncentrace výrazně stoupá v cerebrospinální tekutině u pacientů s Alzheimerovou demencí. Jedna z mnoha studií rozlišila za užití ubikvitinu, celkového tau a Abeta 42 Alzheimerovu chorobu do pěti rozdílných podskupin. V zásadě byla pomocí této metody u pacientů s Alzheimerovou demencí zjištěna vysoká hladina ubikvitinu a celkového tau a naopak nízká koncentrace Abeta 42. Nevýhodou této studie byly nevýrazné rozdíly v hodnotách zdravých jedinců a pacientů s Alzheimerovou chorobou (Lönneborg, 2008).

3.2. Periferní biomarkery

V současné době se vědci zaměřují zejména na periferní biomarkery, protože odběr krve pacienta nezatěžuje tolik jako lumbální punkce. Odběry krve se také mohou provádět častěji než odběr cerebrospinální tekutiny (Marksteiner, 2008).

V posledních několika letech byly provedeny pokusy k identifikaci periferních biomarkerů v plasmě, séru či cirkulujících buňkách. Stanovuje se především Abeta peptid a amyloidní prekurzorový protein (APP) v plasmě, a také sekretázy v destičkách (Borroni a kol., 2006). Další skupinou markerů stanovovaných v krvi jsou sloučeniny, které se podílejí na nespecifické zánětlivé reakci, která probíhá v mozku a je vyvolána přítomností senilních plaků v tkáni.

3.2.1. Abeta peptid v plasmě

Amyloidní plaky jsou základním znakem neuropatologie Alzheimerovy demence. Za alternativní zdroj Abeta v plasmě lze považovat krevní destičky. Abeta se vyskytuje, jak již bylo popsáno, ve dvou základních formách, Abeta 40 a 42 (Blennow a kol. 2006).

Jedna z mnoha studií ukázala, že koncentrace Abeta 40 a 42 v plasmě pacientů s Alzheimerovou chorobou nejsou příliš rozdílné od hodnot u kontrol. Nedávná studie však poukázala na fakt, že vyšší hodnoty Abeta 42 v plasmě jsou rizikovým faktorem pro rozvoj Alzheimerovy demence. Vyšší hodnoty Abeta 42 se v plasmě vyskytují zejména u pacientů s familiárním typem Alzheimerovy demence, neboť u těchto dochází k mutaci všech forem APP v organismu, tedy i APP v krevních destičkách. Následkem těchto změn dochází ke štěpení APP příslušnými sekretázami a vzniku Abeta 42. Je prokázáno, že pacienti s touto nemocí nebo osoby, u kterých se nemoc rozvinula během 5 let po sběru plazmy, měly vyšší hodnotu Abeta 42.

Hodnoty Abeta 42 u pacientů s Alzheimerovou demencí v plasmě se v jednotlivých

studiích liší, proto tento biomarker není vhodný pro konečnou diagnostiku Alzheimerovy choroby, může být ale použit ve vybraných případech pro předpověď rizika rozvoje této choroby (Borroni a kol., 2006).

Bylo prokázáno, že měření Abeta v plazmě přináší dobré výsledky v monitorování průběhu a úspěšnosti terapie (Lönneborg, 2008).

3.2.2. Formy amyloidního prekurzorového proteinu v destičkách

Nejvýznamnějšími buňkami krve, které obsahují amyloidní prekurzorový protein (APP) jsou krevní destičky. Krevní destičky totiž vykazují koncentraci těchto forem APP, které se nachází v mozku. Je známo, že rozpustný APP je vysoce homologní s proteasou Nexin II, a inhibuje tedy aktivitu krevních koagulačních faktorů. Použití krevních destiček, jako buněk odrážejících neurochemické procesy, je výhodné díky nálezu podobných rysů u krevních destiček a neuronů. Krevní destičky skladují a uvolňují neurotransmitery a exprimují příslušné přenašeče neurotransmiterů.

Mnoho laboratoří nezávisle na sobě popsaly změny v metabolismu APP v krevních destičkách u pacientů s Alzheimerovou demencí ve srovnání s kontrolami. Dvě výzkumné skupiny ukázaly, že Alzheimerova demence je spjata s výraznějším snížením v množství APP o vyšší molekulové hmotnosti (130 kDa) ve srovnání s APP o nižší molekulové hmotnosti (110 kDa). Následně byl stanoven podíl forem APP (130 kDa/110 kDa), který je u pacientů s Alzheimerovou demencí nižší než u zdravých jedinců. Stanovení tohoto poměru by díky vysoké citlivosti (80 – 95 %) mohlo být užito ke zlepšení diagnostické přesnosti nebo jako vodítko pro stanovení následné terapie.

Podíl APP forem v krevních destičkách odráží neuropatologické znaky Alzheimerovy choroby a je tedy možné tuto nemoc rozpoznat již ve velmi časném stadiu. Amyloidní prekurzorový protein je důležitý také pro rozlišení Alzheimerovy choroby od ostatních typů demencí. Stanovení je spolehlivé a neagresivní.

V poslední době je také možné díky stanovení podílu forem APP předpovědět rozvoj Alzheimerovy choroby u pacientů s mírnou poruchou paměti. Citlivost a přesnost této předpovědi je až 83 % (Borroni a kol., 2006).

3.2.3. Sekretázy v krevních destičkách

V krevních destičkách je možno naměřit hodnoty tří klíčových proteinů dráhy amyloidu. Jmenovitě je to beta-sekretáza (BACE) zodpovědná za metabolismus amyloidu, a alfa-sekretáza (ADAM 10) zodpovědná za neamyloidogenní metabolismus.

V destičkách pacientů s Alzheimerovou chorobou je možné prokázat změnu specifických forem APP současně s poklesem aktivity α -sekretázy a vzrůstem aktivity β -sekretázy (Borroni a kol., 2006).

3.2.4. Biomarkery zánětu

V mozku pacientů s Alzheimerovou demencí vyvolávají amyloidogenní depozita řadu zánětlivých odpovědí zahrnujících astrocyty, mikroglie, komplement a akutní fázi zánětu. Předpokládá se, že pacienti s Alzheimerovou demencí mohou vykazovat širokou imunitní dysregulaci, která je detekovatelná v plazmě.

K markerům zánětu, které jsou v průběhu Alzheimerovy demence zvýšeny, se řadí C-reaktivní protein, interleukin (IL)-1 β , tumor nekrotizující faktor α , IL6, α 1-antichymotrypsin a transformující růstový faktor β .

Velmi intenzivně je v dnešní době zkoumán IL6. IL6 je cytokin, jehož hladina stoupá během zánětu a podílí se na proliferaci buněk. Efekt IL6 je zprostředkován receptorem pro IL6, který zahrnuje α -podjednotku a glykoprotein 130. Velká většina studií popisuje zvýšenou koncentraci interleukinu 6 u pacientů s Alzheimerovou demencí (Lönneborg, 2008).

3.3. Biomarkery lipoproteinového metabolismu

Zatímco se jedna teorie zabývá amyloidovou teorií, jiná se zaměřuje na vaskulární rizikové faktory, které významně přispívají k rozvoji Alzheimerovy choroby. Poslední studie ukazují, že mikrovaskulární choroba může přispět k patogenezi Alzheimerovy choroby a k poruše paměti. Vaskulární patologie stárnoucího mozku a Alzheimerovy demence zahrnuje amyloidovou angiopatii, která vyvolává lalokové krvácení, dále ischemii, mikrovaskulární degeneraci, onemocnění hematoencefalické bariéry, poškození bílé hmoty, lakuny či mikroinfarkty.

Poslední studie ukázaly vysoký podíl ischemické choroby srdeční na rozvoji Alzheimerovy choroby. Na zvýšené riziko vzniku této choroby ukazují rizikové faktory typické pro vaskulární demenci a cerebrovaskulární chorobu, jsou jimi vysoké hodnoty celkového cholesterolu, lipoproteinu (a), lipoproteinu o nízké hustotě (LDL) a apolipoproteinu E (APOE).

Identifikace těchto vaskulárních biomarkerů a následná úprava jejich hladin na fyziologické hodnoty může zabránit nebo alespoň snížit rychlost přechodu mírné poruchy paměti v demenci (Solfrizzi a kol., 2006).

3.3.1. Cholesterol a Alzheimerova choroba

Cholesterol je hlavní lipidová součást membrán neuronů a myelinu. Je známo, že cholesterol je v mozku syntetizován *in situ* a že extracerebrální cholesterol významně nepřispívá k obsahu mozkového cholesterolu. Nadbytek cholesterolu v mozku bývá odstraňován do periferie. Mechanismus tohoto transportu je nejasný, ale předpokládá se účast apolipoproteinu E a usnadněného transportu oxidovaného produktu 24S-hydroxycholesterolu. Nicméně může být zapojen i další zatím neznámý mechanismus.

Během neurodegenerativních procesů se rozpadá velké množství neuronů, následkem čehož se v mozku pacientů s Alzheimerovou demencí nachází zvýšená

hladina cholesterolu. Pokud by došlo ke snížení cholesterolu v mozku, vedlo by to následně k reverzibilnímu snížení formování Abeta v hipokampu. V některých studiích byly navíc pozorovány snížené sérové hladiny HDL u pacientů s Alzheimerovou chorobou, zatímco ostatní studie pozorovaly zvýšení celkového cholesterolu a LDL u pacientů s Alzheimerovou demencí.

Poslední studie ukázaly, že vysoké hladiny cholesterolu ve středním věku mohou být rizikovým faktorem pro vznik Alzheimerovy demence v pozdějším životě. Několik studií prováděných nezávisle na sobě ale nenalezly žádné významné spojení mezi vysokými hladinami cholesterolu a vznikem Alzheimerovy nebo vaskulární demence. Jiná skupina vědců naopak zjistila, že u Alzheimerovy choroby jsou hladiny celkového cholesterolu nižší a že jediným rizikovým faktorem pro vznik demence je věk. Ačkoliv se názory v jednotlivých studiích značně liší, je hladina celkového cholesterolu ovlivněna APO E genotypem, pohlavím, věkem a stádiem Alzheimerovy demence.

Významný objev přinesl ve své práci Mielke, který zkoumal korelace mezi hladinou cholesterolu a demencí v populaci jedinců starších 70ti let, kteří byli sledováni 18 let. Zvýšené hladiny celkového cholesterolu ve věku 70, 75 a 79 byly spojeny se snížením rizika vzniku demence mezi 79. – 88. rokem života. Tato studie zkoumala pouze nekuřáky. V této studii bylo tudíž zjištěno, že vysoké hladiny celkového cholesterolu ve vyšším věku naopak snižují riziko vzniku demence, což je v kontrastu se studii ukazujícími na riziko vysokých hladin cholesterolu a vzniku demence ve středním věku. Rozdílné výsledky mohou být způsobeny právě rozdílným věkem sledovaných osob.

Cirkulující lipoproteiny a lipidy mohou být upraveny na normální hladinu dietou nebo pomocí farmakologických přípravků. Měřením celkového cholesterolu můžeme posuzovat efekt léčby vysokých hladin lipidů. Některé epidemiologické studie ukazují, že rozvoj Alzheimerovy demence může být snížen u pacientů léčených inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzymtransferazy (tzv. statiny). Jeden výzkum probíhající ve třech nemocnicích ve Spojených státech epidemiologickou studii potvrdil, když zjistil, že prevalence Alzheimerovy demence u pacientů užívajících statin byla o 60 – 70 % nižší než u neléčených pacientů. Statiny vykazují pleiotropický efekt, který zahrnuje regulaci produkce NO, zánětlivých procesů, oxidační aktivity a redukci volného celkového cholesterolu. Dalšími efekty statinů jsou například redukce aterosklerózy, endoteliální ochrana a redukce oxidace LDL .

Laboratorní studie ukázaly, že cholesterol může hrát také roli v biosyntéze Abeta a že simvastatin redukuje hladinu Abeta42 a Abeta 40, čili i riziko vzniku Alzheimerovy

demence. Analýzy tedy ukázaly, že užívání léků snižujících hladiny lipidů je spojeno s nižším výskytem demence.

Názory na vliv cholesterolu na Alzheimerovu chorobu se různí, většina studií se ale shoduje v tom, že vysoké hladiny cholesterolu přispívají ke vzniku demence (Solfrizzi a kol., 2006).

3.3.2. 24S-Hydroxycholesterol

24S-hydroxycholesterol vzniká přeměnou nadbytečného cholesterolu v mozku. Tento oxysterol ochotně prochází hematoencefalickou membránou. Denní tok oxysterolu z mozku se pohybuje kolem 7 mg. Měření koncentrace 24S-hydroxycholesterolu v plazmě reprezentuje rovnováhu mezi produkcí v mozku a metabolismem v játrech. Hodnoty v plazmě také ukazují mírnou souvztažnost s hodnotami v mozkomíšním moku. Tento oxysterol byl nalezen ve zvýšené míře v mozkomíšním moku u pacientů s Alzheimerovou demencí nebo mírnou poruchou paměti. Z tohoto vyplývá, že 24S-hydroxycholesterol bývá zvýšen v časném stádiu nemoci v likvoru.

Na druhé straně však docházelo u pacientů dlouhodobě léčených niacinem nebo statiny k snižování plazmatických hladin 24S-hydroxycholesterolu, proto se u takto léčených pacientů stanovuje spíše 27S-hydroxycholesterol. U Alzheimerovy demence je postižen celý periferní metabolismus cholesterolu, tedy i 27S-hydroxycholesterol je u Alzheimerovy choroby zvýšen. (Solfrizzi a kol., 2006).

3.3.3. Lipoprotein (a)

Lipoprotein (a) je částice vlastnostmi podobná LDL, od kterého se liší přítomností apolipoproteinu (a), jenž je navázán na molekulu apo B100 disulfidickými vazbami. Molekula apo(a) je velmi variabilní, vyskytuje se v několika isoformách, jejichž relativní molekulová hmotnost kolísá od 300 do 800 kDa. Apolipoprotein (a) má velkou strukturální podobnost s plazminogenem. Plazmatické koncentrace Lp(a) se

pohybují od 0 do 1,20 g/l a jsou nepřímo úměrně geneticky determinovány velikostí isoformy apolipoproteinu (a). Vysoké hodnoty lipoproteinu (a) jsou spjaty s aterosklerózou či cerebrovaskulárním onemocněním. Vyšší riziko zvýšených hladin tohoto lipoproteinu je u nositelů genu pro kratší isoformu apolipoproteinu (a).

Apolipoprotein (a) není pouze součástí metabolismu lipoproteinů v plasmě, ale byl detekován také v mozku. Zvýšené hladiny lipoproteinu (a) byly zjištěny u pacientů s vaskulární demencí a také u pacientů s Alzheimerovou demencí, kteří prodělali infarkt mozku. Z těchto zjištění se usuzuje, že tento lipoprotein by mohl být dalším rizikovým faktorem v rozvoji Alzheimerovy choroby.

Patologofyziologie mechanismů, díky kterým dochází ke zvýšení hladiny lipoproteinu (a) u nemocných s demencí, jsou dosud neznámé. Jednou z možností je, že lipoprotein (a) se zvyšuje díky probíhajícímu zánětu, neboť podobné zvýšení bylo pozorováno i u jiných zánětlivých onemocnění. Je také možné, že zvýšená hladina lipoproteinu (a) souvisí pouze s rizikem ischemického poškození mozku, a protože ischemie může urychlit změny v nervové tkáni, které se projeví jako demence, jsou vysoké hladiny lp(a) zjištěny u pacientů s Alzheimerovou demencí. Současně s vysokými koncentracemi lp(a) byly nalezeny také vysoké koncentrace LDL u pacientů s Alzheimerovou demencí. Tedy i LDL má určitý vztah k patologii Alzheimerovy choroby (Solfrizzi a kol., 2006).

3.3.4. Apolipoprotein E

Jako apolipoproteiny jsou označovány specializované bílkoviny amfipatického charakteru, které se spojují s polárními lipidy a vytvářejí s nimi obal lipoproteinové částice. Umožňují tím rozpustnost lipidů ve vodném prostředí.

ApoE je protein složený z 299 aminokyselin. Gen pro ApoE se nachází na 19. chromozómu (19q13.2). Skládá se ze čtyř exonů a třech intronů. Byly identifikovány tři běžně se vyskytující alely genu pro ApoE – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ a $\epsilon 4$, které kódují tři isoformy lipoproteinu: ApoE2, ApoE3 a ApoE4. Jedinci pak mohou být nositeli jedné (homozygocie) či kombinace dvou izoform (heterozygocie) ApoE. Apolipoprotein E zprostředkovává vazbu některých lipoproteinů (VLDL, chylomikrony) na LDL-receptor a na receptor pro zbytkové chylomikrony. ApoE je rovněž inkorporován do HDL (jako HDL-E) a jeho úkolem je distribuovat cholesterol mezi buňky. Apolipoprotein E také

urychluje proteolytické štěpení abeta peptidu, což zabraňuje vzniku Alzheimerovy demence (Zima, 2007).

Fyziologická koncentrace apolipoproteinu E v séru dosahuje hodnot mezi 30 a 250 mg/l. Alela $\epsilon 4$ je spojena s nižšími hladinami apolipoproteinu E a významně zvyšuje riziko vzniku Alzheimerovy choroby v mladším věku. Lidé se dvěma kopiemi ApoE $\epsilon 4$ alely mají významně vyšší riziko Alzheimerovy demence a nižší věk začátku příznaků ve srovnání s těmi, kteří tuto alelu nemají. Při porovnání pacientů s mírným kognitivním poškozením se ukázalo, že u pacientů s genotypem $\epsilon 4/\epsilon 4$ docházelo k většímu poškození paměti, snížení schopnosti zvládat běžné denní činnosti a také k výraznější atrofii hippocampu.

Výzkumy zaměřující se na apolipoprotein E se významně liší svými výsledky, čili ApoE prozatím nemůže být použit jako biomarker pro jednoznačné stanovení Alzheimerovy choroby (Solfrizzi a kol., 2006).

4.3.5 Homocystein

Homocystein je neesenciální sirná aminokyselina, která je meziproduktem metabolické přeměny methioninu na cystein. Homocystein je také meziproduktem v transulfurační cestě, ve které dochází k přeměně na cystathion v procesu závislém na vitamínu B6. Nedostatek vitamínu B6 má za následek zvýšení hladiny homocysteinu v krvi. Zvýšená koncentrace homocysteinu je rizikovým faktorem vzniku kardiovaskulárních chorob, periferních cévních onemocnění a může mít toxický efekt na neurony v centrálním nervovém systému (Zima, 2007).

Současné studie poukazují na fakt, že zvýšená koncentrace homocysteinu je rizikovým faktorem pro vznik Alzheimerovy choroby. Zvýšená koncentrace homocysteinu může být podmíněna geneticky či hormonálně, ale většinou vzniká dlouhodobým vlivem chybného složení stravy. Výskyt vysokých hladin homocysteinu je ve většině případů spojen s nedostatkem folátů, tedy kyseliny pantothenové. Koncentrace, která dosahuje hodnot nad 14 $\mu\text{mol/l}$ zdvojnásobuje riziko vzniku Alzheimerovy demence. Vysoké koncentrace lze snížit suplementací vitamíny B6 a B12 (Solfrizzi a kol., 2006).

Závěr

Alzheimerova demence je v současné době onemocnění, které se stává celosvětovým problémem. Postižení touto chorobou se vyznačují zapomnětlivostí a v pokročilém stádiu nemoci nejsou schopni vykonávat běžné denní povinnosti.

Pro efektivní léčbu Alzheimerovy demence je nutné, aby tato byla diagnostikována co nejdříve. V současné době se používá zejména neuropsychologické metody, která na chorobu poukáže již v poměrně brzkém počátku. Tato metoda zahrnuje velké množství psychologických a znalostních testů, jejichž výsledky umožní posoudit stav pacienta. Další možností diagnostiky je zobrazovací metoda, která poukáže na změny v mozku, tedy zejména na amyloidní plaky a neurofibrilární změň. Stále větší pozornost se ale upírá na diagnostiku laboratorní, čili vyšetření biomarkerů charakterizujících nemoc. Pomocí studia biomarkerů by byla možnost přesnějšího a časnějšího určení, zda se jedná právě o Alzheimerovu chorobu a také lepší indikace léčby.

Biomarkery Alzheimerovy choroby lze stanovit v mozkomíšním moku, jehož odběr je ale pro pacienta zatěžující a nelze jej tedy často opakovat. Proto je snaha o identifikaci plazmatických markerů, které by stejně dobře jako likvorové markery odrážely patologii nemoci.

Nejvýznamnějšími markery stanovovanými k určení Alzheimerovy demence jsou zejména Abeta 42 a tau protein. Abeta 42 lze použít k časné diagnostice Alzheimerovy demence, což je přínosné, nepřináší však dobré výsledky v odlišení Alzheimerovy choroby od jiných typů demence. Významné zvýšení celkového tau nastává u pacientů s mírnou poruchou paměti, která se později rozvine v Alzheimerovu chorobu. Měření koncentrace Abeta 42 a tau by mohlo do budoucna být důležité pro zavedení časné terapie. Stejně výsledky jako celkový tau přináší i měření hyperfosforylovaného tau. V současné době se hodně stanovuje kombinace t-tau a Abeta 42 nebo p-tau a Abeta 42, které umožní odlišit Alzheimerovu demenci od ostatních demencí. Současné měření hladin ubikvitinu, celkového tau a Abeta 42 napomohlo k rozlišení Alzheimerovy demence do pěti podskupin. Pro časnou diagnostiku a ke stanovení antioxidační experimentální terapie by se daly použít biomarkery oxidačního stresu. Velmi dobré výsledky přineslo stanovení podílu forem APP v krevních destičkách, což je dobré právě díky možnosti častého odběru krve.

Biochemické markery Alzheimerovy demence

Podíl APP je možno využít jednak k časné diagnostice a jednak k odlišení Alzheimerovy choroby od ostatních typů demence. V současné době se pozornost obrací na biomarkery lipidového metabolismu. Bylo zjištěno, že dlouhodobé užívání léků na snížení cholesterolu významně přispívá k poklesu rizika rozvoje Alzheimerovy demence. Čili na rozvoj této demence má výrazný vliv také životní styl.

Monitorování průběhu nemoci a úspěšnosti terapie, ke které se používají zejména inhibitory acetylcholinesterázy, je možné stanovením koncentrace Abeta peptidu v plazmě. Problémem stále zůstává velká odlišnost ve výsledcích získaných různými laboratořemi.

Rozvoj laboratorních metod a zkoumání nových biomarkerů, které by mohly být užity zejména k časné diagnostice a monitorování úspěšnosti terapie, je velice přínosné a pacientům s Alzheimerovou chorobou přináší naději na zpomalení průběhu nemoci již ve velmi brzkém stádiu.

Zkratky

Abeta	β – amyloid
ADAM 10	α -sekretáza
APOE	apolipoprotein E
APP	amyloidogenní prekurzorový protein
BACE	β -sekretáza
CDK5	cyklin dependentní kináza
GSK3	kinázaGlycogen synthase kinase 3
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
IL	interleukin
LDL	lipoprotein o malé hustotě
MDBs	mikrotubuly vázající doména (microtubule binding domains)
NFT	neurofibrilární změť (neurofibril tangles)
p – tau	fosforylovaný tau protein
t – tau	celkový tau protein
VLDL	lipoprotein o velmi malé hustotě (very low density lipoprotein)

Seznam použité literatury

Adam, P. Cytologie likvoru. STAPRO s.r.o, Pardubice. 1995, 4 – 17

Aluise, Ch. D. Rena, A. S. Butterfield, A. Peptides and proteins in plasma and cerebrospinal fluid as biomarkers for the prediction, diagnosis, and monitoring of therapeutic efficacy of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008, 1782, 549 – 558

Blennow, K. De Leon, M. J. Zetterberg, H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006, 368, 387 – 403

Borroni, B. Di Luca, M. Padovani, A. Predicting Alzheimer dementia in mild cognitive impairment patients. Are biomarkers useful? *Eur. J. Pharmacol.* 2006, 545, 73 – 80

Crouch, P. J. Harding, E. White Anthony, R. Camakaris, J. Bush, A. I. Masters, C. L. Mechanisms of A β mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 2008, 40, 181 – 198

Formichi, P. Battisti, C. Radi, E. Federico, A. Cerebrospinal fluid Tau, Abeta and phosphorylated Tau protein for the diagnosis of Alzheimer disease. *J. Cell. Physiol.* 2006, 208, 39 – 46

Hernández, F. Avilla, J. Tautopathies. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007, 64, 2219 – 2233

Internet 1: Kolektiv autorů. Ubiquitin. Wikipedia, 14.4.2009. přístupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin>

Lönneborg, A. Biomarkers for Alzheimer Disease in cerebrospinal fluid, urine and blood. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2008, 12, 307 – 320

Marksteiner, J. Cerebrospinal fluid biomarkers for diagnosis of Alzheimer's disease: beta-amyloid (1-42), tau, phospho-tau-181 and total protein. *Drugs of Today*. 2007, 43, 423 – 431

Racek, J. *Klinická biochemie*. Galén, Praha. 2006, 269 - 278

Solfrizzi, V. D'Introni, A. Colacicco, A-M. Capurso, C. Todarello O. a kol. Circulating biomarkers of cognitive decline and dementia. *Clinica Chimica Acta*. 2006, 364, 91 – 112

Šťastný, F. Alois Alzheimer: Příběh jedné nemoci. *Vesmír*. 2007, 86, 251 - 253

Tichý, J. a kol. *Neurologie*. Karolinum, Praha. 1997, 71 – 91

Zima, T. *Laboratorní diagnostika*. Galén a Karolinum, Praha. 2007, 417 - 446