

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Diagnostika Alzheimerovy choroby – možnosti a omezení

Zuzana Hajdová

Bakalářská práce

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana Hajdová**
Osobní číslo: **C09271**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Diagnostika Alzheimerovy choroby - možností a omezení.**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte recentní literaturu charakterizující onemocnění Alzheimerovu chorobu, popište klinické příznaky choroby, její diagnostiku a monitorování průběhu onemocnění, možnosti její terapie.
2. Popište klinicky významné biomarkery uváděné do souvislosti s diagnostikou Alzheimerovy chorob, zaměřte se na látky v mozkomíšním moku a krevní plazmě. Tyto vytipované biomarkery charakterizujte, popište strukturu a jejich význam, váhu v diagnostice choroby.
3. Vypracujte literární rešerši na dané téma v délce 30 - 40 normovaných stran včetně obrázků a schémat.
4. Při vyhledávání literárních údajů využijte všech dostupných databází NCBI (National Center for Biotechnology Information), PubMed, Scopus, WOS atd. podle pokynů školitele.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **ca 30 stran**

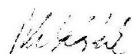
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **3. října 2011**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

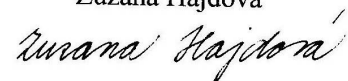
Tuto práci jsem vykonala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněná ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 20. 6. 2012

Zuzana Hajdová



Poděkování

Děkuji vedoucí doc. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady, doporučení literatury a pomoc při zpracování a úpravě bakalářské práce.

ANOTACE

U pacientů s Alzheimerovou chorobou dochází v mozkové tkáni k nadměrné fosforylaci proteinu tau a vzniku neurofibrilárních klubek a také k agregaci β -amyloidu, který vytváří v mozku specifické útvary, tzv. „senilní plaky“. Současná diagnostika Alzheimerovy choroby je převážně založená na behaviorálních a kognitivních testech, na průkazu výrazných patologických změn v mozkové tkáni pomocí zobrazovacích technik a na průkazu a kvantifikaci několika málo biologických markerů stanovovaných v mozkomíšním moku. K jednoznačnému potvrzení diagnózy dochází až *post mortem* a to histologickým nálezem v řezu mozkové tkáně.

KLÍČOVÁ SLOVA

Alzheimerova choroba, senilní plaky, neurofibrilární klubka, tau protein, β -amyloid

TITLE

Diagnosis of Alzheimer's disease – options and limitations

ANOTTATION

In patients with Alzheimer's disease occurs in the brain tissue to excessive phosphorylation of tau protein and the formation of neurofibrillary tangles and also to the aggregation of β -amyloid, which forms the brain-specific features, so-called "senile plaques". The current diagnosis of Alzheimer's disease is mainly based on behavioral and cognitive tests on evidence of significant pathological changes in brain tissue using imaging techniques and the detection and quantification of the few biological markers stipulation in the cerebrospinal fluid. To clear up the diagnosis is post-mortem and histological findings in a section of brain tissue.

KEYWORDS

Alzheimer's disease, senile plaques, neurofibrillary tangles, tau protein, β -amyloid

Seznam použitých zkratek

CAG	triplet cystein-adenosin-guanin
AD	Alzheimerova choroba
NFTS	neurofibrilární klubka
MMSE	Mini-Mental Status
DSM-IV	Diagnostický a Statistický manuál duševních poruch
APP	amyloidní prekurzorový protein
ApoE	apolipoprotein E
MIC	Mild cognitive impairment
PHFS	fibrily z kterých se skládají NFTS
SPs	amyloidní (senilní) plak
A β	β -amyloid
NET	neprilysin
IDE	insulysin
GSK3 β	glykogen-syntáza kináza-3 β
CDK5	cyklin-dependentní proteinová kináza 5
CT	počítačová tomografie
MR	magnetická rezonance
PET	pozitronová emisní tomografie
SPECT	jednofotonová emisní tomografie
MRS	magnetická rezonance spektroskopie
MEG	magnetická encefalografie
FDG	fluoro-deoxy-D-glukózy
PIB	Pittsburgh Compound-B
CSF	mozkomíšní mok
T-tau	celkový tau
P-tau	fosforylovaný tau
n.	nepoužívá se
PK	cAMP závislá protein kináza
PP	proteinové fosfatázy
FTD	frontotemporální demence
BACE-1	β -sekretáza

SOD superoxiddismutáza
GFAP gliové fibrilární kyselé proteiny
GAP43 neuromodulin
NF-L NF protein s lehkým řetězcem
A1AT alfa-1-antitrypsin
A1ACT alfa-1-antichymotrypsin
SORL1 sortilinu příbuzný receptor

Obsah

1. Úvod	10
2. Neurodegenerativní choroby	11
3. Alzheimerova choroba.....	12
3.1. Prevalence.....	13
3.2. Klinický obraz	14
3.3. Genetické a jiné rizikové vlivy AD	15
3.4. Neuropatologie	16
3.4.1. Neurofibrilární klubka	17
3.4.2. Senilní plaky	18
3.5. Léčba Alzheimerovy choroby	20
4. Diagnostika Alzheimerovy choroby.....	21
4.1. Biomarkery	23
4.1.1. Protein tau.....	26
4.1.2. β -amyloid.....	29
4.1.3. Další potenciální biomarkery.....	31
5. Závěr.....	34
6. Použitá literatura:.....	35

1. Úvod

V současné době pozorujeme fenomén prodlužování lidského života. Lidé se dožívají daleko vyššího věku, než tomu bylo dřív. Když člověk stárne, spolu s ním stárnou všechny jeho tkáně a buňky. Je zcela evidentní, že s tím souvisí i zvýšený výskyt chorob, hlavně chorob spojených s degenerací funkční tkáně, např. neurodegenerativní změny v mozkové tkáni u pacientů s Alzheimerovou chorobou.

Alzheimerova choroba je choroba, která těžce zasahuje do života pacienta i jeho příbuzných. Změny mozkové, vyskytující se převážně v oblastech souvisejících s pamětí, mají negativní dopady především na paměť pacienta, změny v chování a halucinace a s tím spojený neklid a deprese.

V dnešní době je o výzkum Alzheimerovy choroby a příčin jejího vzniku velký zájem. Vyvíjí se nové metody v diagnostice choroby a také léčbě. Proto jsem si vybrala Alzheimerovu chorobu jako téma své bakalářské práce. Budu se zabývat zařazením Alzheimerovy choroby, objevitelem Aloisem Alzheimerem, výskytem, příznaky a postupem choroby, rizikovými vlivy pro vznik choroby, charakteristickými lézemi nacházejícími se v mozkové tkáni, léčbou a hlavně diagnostikou zaměřenou na markery v biologickém materiálu.

2. Neurodegenerativní choroby

Neurodegenerace, pomalá a progresivní dysfunkce a postupná ztráta neuronů a axonů v centrální nervové soustavě, je primární patologický rys akutních a chronických neurodegenerativních onemocnění, jako jsou například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, neurotropní virové infekce, cévní mozková příhoda, paraneoplastické poruchy, traumatická mozková zranění a roztroušená skleróza [1].

Většina geneticky podmíněných konkrétně autozomálně dominantních neurodegenerativních onemocnění se dělí do dvou skupin a to na základě společné patologie. Tyto skupiny jsou 1) polyglutaminová onemocnění, 2) tauopatie a synukleinopatie [2].

U polyglutaminových onemocnění je typický nález zmnožení opakujících se tripletů v jednom genomu. Vznikají tak bílkoviny, které se hromadí v jádrech neuronů, tvoří intracelulární inkluze a způsobují smrt neuronů. Všechna polyglutaminová onemocnění jsou progresivní fatální poruchy, které obvykle začínají až v dospělosti a vyvíjí se po dobu 10 až 30 let. Mezi tyto choroby patří Huntingtnova choroba. U Huntingtnovy choroby je to triplet cystein-adenosin-guanin (CAG) genu pro protein huntington na krátkém rameni 4. chromozomu. Nárůst velikosti segmentu CAG vede k produkci abnormálně dlouhé verze proteinu huntington, ten se štěpí na kratší toxické fragmenty, která se váží dohromady, hromadí se v neuronech, narušují jejich funkci a způsobují jejich zánik [2 - 4].

Tauopatie a synukleinopatie vznikají na základě přítomnosti charakteristických plaků. Synukleinopatie je různorodá skupina neurodegenerativních onemocnění, které sdílejí společné patologické léze složené z agregátů nerozpustného proteinu α -synukleinu v neuronech a gliích. Do této skupiny patří Parkinsonova choroba a demence spojená s výskytem Lewyho tělísek. Parkinsonova nemoc je poměrně časté neurodegenerativní onemocnění, prevalence nad 60 let věku je až 1% a s rostoucím věkem výskyt přibývá. Klinický obraz je charakterizován známou tetádou: tremor, akineze, rigidita a porucha posturální stability. Typický pro parkinsonský tremor je jeho klidový charakter, zvýraznění vyvolá stres, únava, počítání a naopak mizí ve spánku. Při akinezi vážně iniciace pohybu, zejména pro automatické pohyby, mizí souhyby (např. pohyby horních končetin při chůzi),

dochází ke zpomalení hybnosti. Rigiditou rozumíme zvýšení svalového tonu, narůstá pasivní odpor při pohybech [2,5,6].

Vláknité inkluze z proteinu tau a degenerace mozkové tkáně v nepřítomnosti β -amyloidních plaků jsou typickými charakteristickými znaky neurodegenerativních tauopatií. Onemocnění, které patří do této skupiny, jsou Pickova nemoc a progresivní supranukleární obrna [7].

Díky velkému technickému pokroku v molekulární genetice a molekulární biologii jsme schopni neurodegenerativní choroby rozpoznat a rozlišit již během života postiženého jedince. Pokrok zobrazovacích technik umožňuje lepší popis a hodnocení zásahu v preklinických a počátečních fázích neurodegenerativních procesů. Alzheimerova choroba (AD podle Alzheimer's disease) obsahuje charakteristické znaky obou skupin a proto se zařazuje samostatně. AD je nejčastější z těchto chorob, postihuje 20-25 milionů lidí na celém světě a je čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích [2,8].

3. Alzheimerova choroba

AD je progresivní a smrtelné neurodegenerativní onemocnění. Nejčastějšími příznaky jsou kognitivní změny, ztráta paměti a změny v chování. AD je spojena s neurodegenerací, nejdříve dochází k synaptickému poškození a následuje funkční ztráta neuronů. Dva hlavní neuropatologické znaky AD jsou extracelulární beta-amyloidní (senilní) plaky a intracelulární neurofibrilární klubka (NFTS). Mozek zdravého dospělého pacienta má asi 100 miliard neuronů, z nichž každý vytváří mnoho větví a tvoří spojení s jinými neurony, tzv. synapse. Na těchto synapsích dochází pomocí mediátorů k přenosu informace. Mozek obsahuje 100 biliónů synapsí, umožňují neustálé rychlé šíření signálů přes mozkové obvody, vytvářet mobilní základ vzpomínek, myšlenky, pocity, emoce, pohyby a dovednosti. Hromadění β -amyloidu mimo synapse vede k narušení komunikace mezi synapsemi a přispívá k buněčné smrti neuronů a dalších podpůrných buněk. Uvnitř neuronů klubka blokuji dopravu živin a dalších molekul a dochází tak ke smrti buňky [9-12].



Obrázek č. 1: *Alois Alzheimer* [15]

K objevům typických patologických změn u AD došlo už v 19. století. Senilní plaky pojmenoval roku 1898 při zkoumání dvou případů senilní demence Redlich [13]. AD však detailně popsal až Alois Alzheimer. Narodil se v roce 1864 v Markbreitu. Maturoval

v roce 1883 v Aschffenburgu. Studoval medicínu v Berlíně, Tübingenu, Würzburgu, kde napsal diplomovou práci nazvanou „Über die Ohrschmalzdusen“ (O ceruminálních žlázách). V nemocnici ve Frankfurtu nad Mohanem se zabýval výzkumem mozkové kůry lidského mozku. V listopadu roku 1901 byla do nemocnice přijatá se známkami demence jednapadesátiletá paní Auguste D., u které Alzheimer po smrti našel v odebrané mozkové tkáni masivní senilní plaky. Vlastním objevem byly neuronální klubka, která našel ve čtvrtině neuronů. Klubka byla nalezena i u „běžné“ senilní demence, Alzheimer však považoval svůj případ za „atypickou formu běžné demence“ charakterizovanou časným začátkem a typickým klinickým průběhem. Referoval o ní roku 1906 na schůzi jihoněmeckých psychiatrů v Tübingenu. Přednáška se jmenovala „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ (O svérázném onemocnění mozkové kůry). Případ byl publikován v roce 1907 a tato publikace je považována za základ definice Alzheimerovy choroby. Roku 1903 Alzheimer opouští Frankfurt a přechází do Mnichova na Královskou psychiatrickou kliniku. Ředitel kliniky a Alzheimerův spolupracovník Emil Kraepelin pojmenoval onemocnění ve své učebnici z roku 1910 Alzheimerovou chorobou. Alois Alzheimer zemřel v roce 1915 na ledvinové selhání ve věku 51 let [1,13 - 15].

Od svého objevení, více než před 100 lety, došlo k velkým vědeckým průlomům ve výzkumu AD. V roce 1960 vědci objevili souvislost mezi poklesem kognitivních funkcí a počtem plaků a klubek v mozku pacientů s AD. AD byla formálně uznána jako choroba. V 70. letech 20. století vědci udělali velký pokrok v pochopení lidského těla jako celku a to hlavně díky objevům nových technologií včetně hybridomové k výrobě monoklonálních protilátek. V 90. letech došlo k lepšímu pochopení nervových buněk v mozku pacientů s AD a později environmentálních, genetických a jiných rizikových faktorů vedoucích k AD [13,16].

3.1. Prevalence

AD je nejčastěji vyskytující se neurodegenerativní chorobou (demencí) vůbec, představuje přibližně 70% všech diagnostikovaných případů demence. Celková prevalence AD v populaci dosahuje 1%. Je to choroba, jejíž prevalence i incidence jsou výrazně závislé na věku. Počet nemocných AD roste exponenciálně z 1% ve věku 60-70 let až na 6% až 8% ve věku 85 let [19]. U žen je riziko vzniku AD vyšší než u mužů a to až 1,9

krát [13]. V současnosti je postiženo více než 24 milionů lidí po celém světě. Kromě toho je hlášeno více než 5 milionů ročně nových případů AD [17-19].

Největší výskyt pacientů nad 60 let věku s demencí je v Severní Americe (6,4%) a Západní Evropě (5,4%), pak následuje Latinská Amerika (4,9%), Čína se západním Pacifikem (4,0%). Odhadovaná roční incidence demence (na 1000 obyvatel) byla nejvyšší v Severní Americe (10,5), pak Latinské Americe (9,2) a v Západní Evropě (8,8). Čísla rostou s vyspělostí zdravotnictví v dané zemi a s dostupností diagnostiky pro pacienty s projevy demence. Je odhadováno, že v naší republice je minimálně 70 000 pacientů s klinicky vyjádřenou touto chorobou, ale spíše jich bude více [13,20,21].

3.2. Klinický obraz

Choroba je rozdělena do 2 podtypů v závislosti na věku nástupu: AD s časným nástupem (presenilní) a AD s pozdním nástupem (senilní). AD presenilní představuje přibližně 1 až 6 % všech případů a začíná se projevovat zhruba od 30 do 60 let. Časně formy AD jsou často geneticky podmíněné. AD s pozdějším nástupem jsou častější formou AD a projevují se okolo 65 let [10,18,19,22].

Pro AD je typický plíživý, pomalý začátek. Mezi prvotní příznaky AD patří zmatenost, poruchy krátkodobé paměti, problémy s pozorností, změny v osobnosti, jazykové potíže a nevysvětlitelné nápady. Tyto příznaky jsou za normálních okolností velmi mírné a často zůstanou bez povšimnutí osobou samou, blízkými pacienta nebo zdravotníky. AD vede postupně ke zhoršení kognitivních a paměťových funkcí, změny osobnosti, nevypočitatelnému chování a ke ztrátě kontroly nad tělesnými funkcemi. Pacienti s AD často přežívají poslední měsíce a někdy i roky ve vegetativním stavu. Někdy může nastat jakési zdánlivé zastavení či zpomalení průběhu choroby, které trvá určitý čas, a pak opět dochází k další progresi [16,17].

V průměru žijí lidé 8 až 10 let od objevení prvních klinických příznaků AD. Presenilní formy, především s familiárním výskytem, mají zpravidla rychlejší průběh. Pacienti umírají v důsledku všeobecného vyčerpání, podvýživy, úrazů, selhání základních životních funkcí nebo na zápal plic [16,17,19].

Klinického obrazu využívají lékaři v diagnostice. Neuropsychologické testy pomáhají identifikovat chování a duševní příznaky spojené se změnami a abnormální funkcí mozku. Mezi tyto testy patří Mini-Mental Status (MMSE). Zahrnuje testy paměti,

pozornosti, matematických výpočtů a jazyku. Také se lékaři mohou při stanovení diagnózy opřít o kritéria uvedená v Diagnostickém a Statistickém manuálu duševních poruch (DSM-IV). Pro splnění kritéria DSM-IV pro demenci, je požadováno následující: příznaky musí zahrnovat pokles v paměti a v nejméně jedné z následujících kognitivních schopností:

1. Schopnost vytvářet souvislý projev nebo pochopit mluvený nebo psaný jazyk.
2. Schopnost rozpoznat a identifikovat objekty za předpokladu, že nedošlo ke změně smyslové funkce.
3. Schopnost vykonávat motorické aktivity za předpokladu, že nedošlo ke změně pohybové schopnosti, smyslové funkce a pochopení požadovaného úkolu.
4. Schopnost myslet abstraktně, učinit zdravý úsudek a plánovat a provádět složité úkoly [12,16].

3.3. Genetické a jiné rizikové vlivy AD

Obě formy AD presenilní a senilní (familiární a sporadická) se z vyšší četností vyskytuje v některých rodinách, vykazuje tedy familiární agregaci. Nejčastější autozomálně dědičnou genetickou příčinou patogeneze u familiární formy AD je mutace genů pro APP (amyloidní nekurzorový protein), presenilin 1 a 2. Tyto geny se nacházejí na 21. chromozomu a bylo zjištěno více než 160 mutací na těchto genech, které vedou k produkci patologického peptidu β -amyloidu, který se hromadí v mozku ve formě plaků. I kdyby jen jeden z těchto genů obsahoval mutaci, bude se u dotyčné osoby téměř nevyhnutelně brzy vyvíjet počátek AD. To znamená, že pokud je jeden z rodičů nemocen, mají jeho děti 50% šanci vzniku onemocnění. U většiny případů familiární AD s mutacemi APP dochází k propuknutí AD ve věku mezi 40 až 50 lety a představuje méně než 1% všech případů AD [11,13,19,22,23].

Nejdůležitějším geneticky rizikovým faktorem pro sporadickou formu AD je nosičství genu pro apolipoprotein E (ApoE) na 19. chromozomu. ApoE se vyskytuje v několika izofotách - ϵ_2 a ϵ_3 a ϵ_4 . Nejčastěji se vyskytuje izoforma ApoE ϵ_3 , u které se vědci domnívají, že nepřispívá k rozvoji AD. ApoE ϵ_2 je poměrně vzácná alela a poskytuje určitou ochranu před vznikem onemocnění AD. ApoE ϵ_4 se vyskytuje u 40% nemocných s pozdním nástupem AD. Studie potvrdily, že APOE ϵ_4 alela zvyšuje riziko vzniku AD, ale příčina mechanismu je neznámá. Potvrdilo se pouze, že v případě přítomnosti ApoE ϵ_4

se snižuje věk propuknutí AD, i když nosičství této alely samo o sobě žádné konkrétní dopady na jednotlivé nositele nemá. Proto se ApoE ϵ -4 nepovažuje jako důležitý biomarker pro AD, ale je přidáván do diagnostického panelu biomarkerů [13,19,22 - 24].

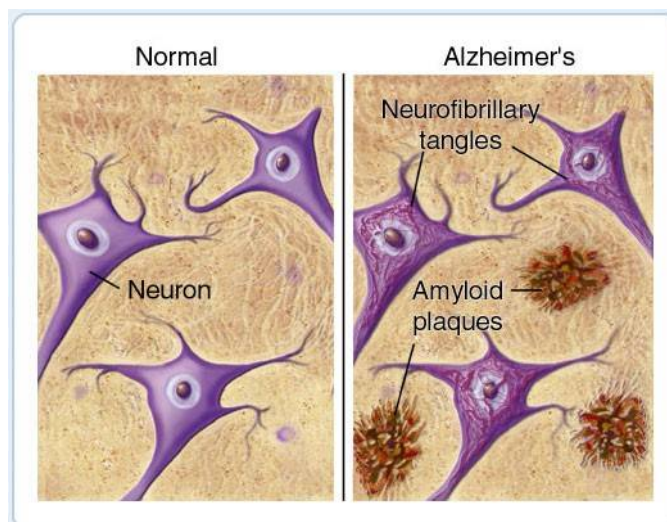
Jak přispívají tyto geny v patogenezi AD, se zabývalo mnoho studií. Konkrétní podíl na progresi AD však zůstává nejasný. To naznačuje, že AD je podmíněná kombinací vlivů genetických s vlivy zevního prostředí. Zdraví mozku je úzce spojeno se zdravím celého orgánu srdce a cév. Protože je mozek orgán z největší sítě cévního zásobení v těle, kardiovaskulární onemocnění jako je vysoký cholesterol, vysoký krevní tlak, diabetes mellitus 2. typu, kouření a obezita mohou být rizikovým vlivem pro vznik neurodegenerativního onemocnění včetně AD [12,13,19].

Mezi normálním stárnutím a prvními příznaky AD se může nacházet přechodný stav zvaný MIC (podle anglického Mild cognitive impairment). Je to stav, kdy už má člověk problémy s pamětí a základními kognitivními schopnostmi. A pokud se u pacienta vyskytuje MIC, je velká pravděpodobnost, že se vyvine v AD. Mezi rizikové vlivy jsou počítány také úrazy hlavy a nižší vzdělání [12,18].

3.4. Neuropatologie

Při Alzheimerově chorobě dochází k podobným změnám jako při stárnutí. Snižuje se hmotnost a objem mozku, snižuje se tloušťka mozkové kůry, rozšiřují se mozkové komory. Změny jsou však mnohem nápadnější u presenilní formy AD, kdy změny hmotnosti oproti zdravým jedincům mohou být až o 300 g [13,25].

Obrázek č. 2: Plaky a klubka [16]



Patologické změny mozkové tkáně u AD se nejčastěji nacházejí v místě asociace mozkové kůry a ve středních temporálních lalůčkách. Patologické léze se začínají nejdříve vyskytovat v střední temporální oblasti, zvláště amygdale, hippocampové CA-1 oblasti, entorhinalní kůře a transentorhinalních oblastech. Neuropatologickými charakteristickými znaky AD jsou "pozitivní" léze, jako amyloidní plaky, mozkové amyloidové angiopatie a neurofibrilární spleti a "negativní" léze, jako jsou neuronové a synaptické ztráty. Dřívější studie naznačují, že stupeň kognitivní poruchy u AD koreluje s hustotou těchto lézí. Nicméně novější studie [18] ukazují, že i přes zvyšující se demenci, může počet senilních plaků a NFTS zůstat stabilní po mnoho let. V nedávné studii o stárnutí v Baltimore (Baltimore Longitudinal study on aging) přítomnost patologie neprokázalo zvýšenou pravděpodobnost úbytku kognitivních funkcí. Proto ačkoli senilní plaky a NFTS jsou klasické patologické znaky AD, jejich množství není dobrým ukazatelem závažnosti onemocnění. Místo toho ztráta pyramidových buněk nebo ukazatelů neuronální konektivity jako je ztráta synapsí nebo neuritické změny, zřejmě nejlépe koreluje s poklesem kognitivních funkcí. Ztráta synapsí a axonální patologie jsou pravděpodobně klíčové neuropatologické funkce vedoucí k demenci u těchto neurodegenerativních onemocnění [9,10,18,23,26].

Společně tyto údaje podporují koncepci preklinické AD fáze, během které se plaky a následně NFTS, hromadí přibližně 10 až 20 let před nástupem kognitivního poklesu [9].

3.4.1. Neurofibrilární klubka

Intracelulární neurofibrilární klubka (tangles, NFTS) poprvé popsal ve svém článku Alois Alzheimer a jsou dodnes považovány za základní mikroskopický nález u AD. Klubka představují degenerativní změnu buněčného skeletu, která se jeví v histologických technikách jakožto hustá spleť vláken bizarních tvarů vyplňující těla neuronů, zejména frontální kůry, amygdaly a hippocampu. Spleti degenerovaných neurofibril jsou lokalizovány perinukleárně. Ultrastruktura NFTS je složená z fibril, které měří v průměru 10 nm, vyskytují se v párech a tvoří 3D konformace o velikosti 65 nm. Malá část vláken NFTS tvoří páry a mají vzhled rovných vláken bez periodicity PHFS. Ty se většinou nacházejí disperzně v neuropilu nebo v blízkosti senilních plak. Hlavní složkou NFTS je mikrotubulárně asociovaný protein tau, který je abnormálně hyperfosforylovaný v místech

potencionální fosforylace [17,25,26]. Množství NFTS koreluje se závažností kognitivní poruchy [27].

NFTS mohou být zobrazeny pomocí impregnace stříbrem, jako je technika Gallyas nebo Bieschowski [25]. Alternativní metodou je barvení fluorescenčními barvami, jako je Thioflavin-S, pomocí nichž lze rozpoznat strukturu β -skládaného listu párových šroubovicových vláken nebo imunohistochemické techniky s protilátkami proti abnormálně fosforylovanému tau proteinu [25,26].

Existuje řada dalších proteinových složek spojených s neurofibrilárními klubky, jako ubiquitin a cholinesterázy, ale protein tau je považován za rozhodující složkou [25].

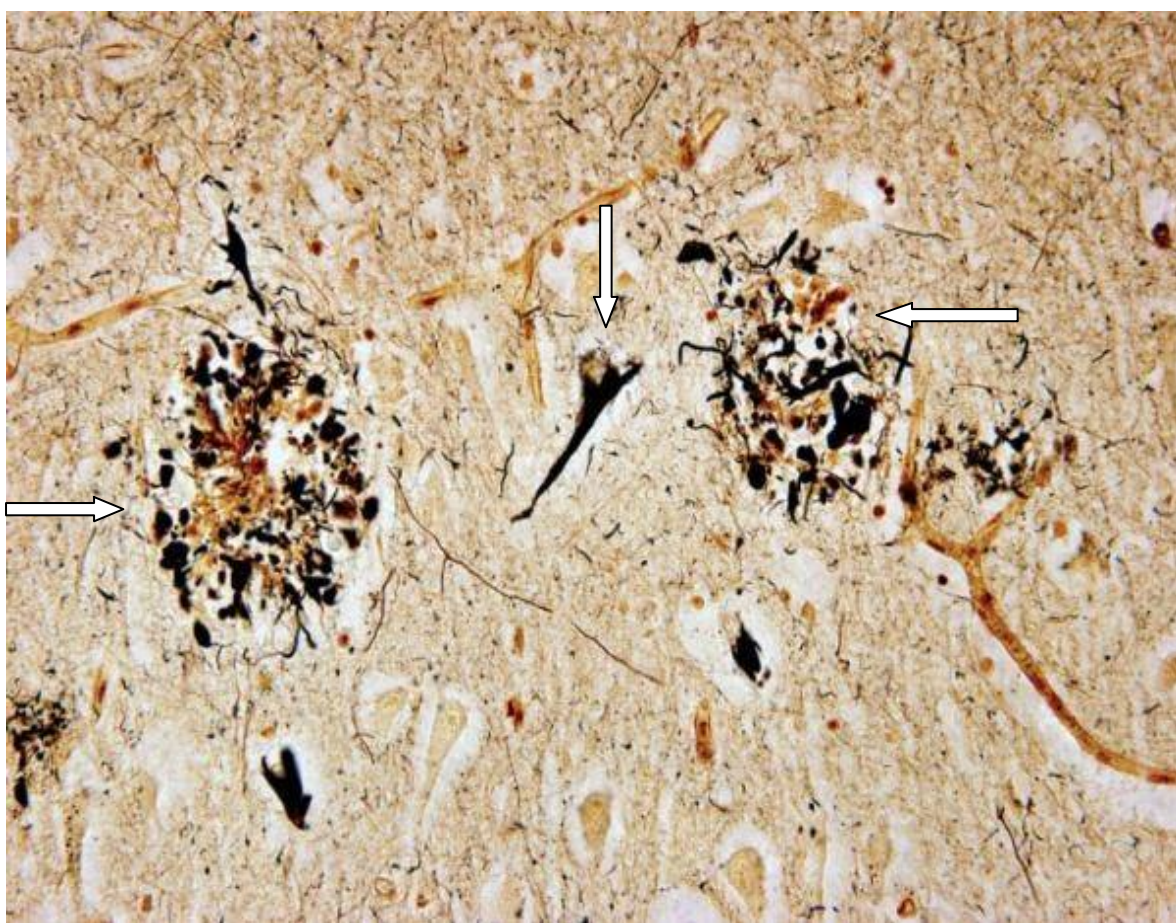
3.4.2. Senilní plaky

Mezi jiné důležité patologické léze, se kterými se setkáváme u pacientu s AD patří senilní (amyloidní) plak (SPs). Jsou to kulaté extracelulární léze 10-200 μm v průměru, které byly původně určeny a zařazeny použitím Bielschowského stříbrné techniky, která se dodnes používá [18]. Mohou se nacházet také u starších non-dementních jedinců, ale v mnohem nižším množství, než u pacientů s AD. Tyto formy jsou ještě nezralé, nebo netoxické. Senilní plaky jsou složité struktury, které jsou definovány nahromaděním 4 kDa proteinu extracelulárně s konfigurací beta-skládaného listu s názvem amyloid- β ($A\beta$). $A\beta$ je dlouhý 37 - 43 aminokyselin a vzniká proteolytickým štěpením APP β - a γ - sekretázami [28]. Převládající konfigurace beta-skládaný list tohoto proteinu propůjčuje schopnost vázat barvivo Kongo červeně a produkovat dvojlom při prosvícení polarizovaným světlem. V obvodu plaku se setkáváme s 1 až několika mikrogliálními buňkami a méně často reaktivními astrocyty. Zda jsou tyto mikrogliální buňky aktivně zapojeny do kaskády nebo způsobují zánět je stále předmětem intenzivního výzkumu [18,25,29].

Nosologie senilních plaků se v průběhu let vyvíjela. Rozdělují se na podtypy - difúzní, primitivní, neuritické, kompaktní, s jádrem a vatové. Pro praktické účely jsou jen dva typy běžně používané v neuropatologických analýzách, a to difúzní a neuritické. Difúzní senilní plaky představují nejčasnější mozkové léze v AD a bylo navržena hypotéza, která není dosud prokázaná, že tyto plaky progredují do klasické a kompaktní plakety. Typické neuritické, klasické, nebo kompaktní plaky jsou kulaté extracelulární léze 10-50 μm v průměru. Difúzní senilní plaky bývají různorodé co do velikosti tak frekvence.

Většina rozptýlených plaků jsou menší než 20 μm v průměru. Senilní plaky všech typů jsou distribuovány převážně v mozkové kůře [18].

Tvorba $A\beta$ je považována za hlavní mechanismus vzniku AD. Nejen že je zde nepřehledné množství histopatologických, biochemických, genetických dat, které podporují klíčovou úlohu $A\beta$ v patogenezi AD, ale žádná jiná hypotéza se za poslední dvě desetiletí intenzivního výzkumu onemocnění neobjevila ve spojení s AD. Patogeneze AD spočívá v nerovnováze mezi výrobou a odstraněním $A\beta$, to vede k postupnému hromadění a způsobuje řadu reakcí vedoucích k synaptické dysfunkci, mikroglyóze a ztrátě neuronů [29].



Obrázek č. 3: *Fotografie temporální kůry pacienta s Alzheimerovou chorobou, barvení technikou Bieschowski, zvětšení 400x, dva senilní plaky a mezi nimi neurofibrilární klubko [25].*

3.5. Léčba Alzheimerovy choroby

V současné době neexistuje žádná účinná léčba ani preventivní opatření, které by napomáhaly předcházet AD, zastavily progresi nebo oddálily nástup nemoci [9]. Některé drogy nebo jiné látky např. ze skupiny acetylcholinesteráz mohou pomoci s kognitivními a behaviorálními příznaky a zlepšit tak kvalitu života pacientů s AD. Léky se dělí na léky zmírňující ztrátu paměti a na léky ovlivňující změny chování [9,19,30].

Vzhledem k tomu, že u pacientů s AD dochází k degeneraci neuronů s postižením cholinergního přenosu v hippocampu a přední, bazální části mozku, což jsou oblasti související s pamětí a poznáváním a také tak dochází k poklesu úrovně cholinergních markerů, cholinacetyltransferázy a acetylcholinesterázy, je jednou z léčebných strategií zvyšování hladiny intrasynaptického acetylcholinu, tedy podávání inhibitorů acetylcholinesterázy [31]. Schválenými léky jsou např. Aricept, Exelon, Razadyne, Cognex, Donepezil a Galantamin. Také podávání memantinu (Namenda) slouží k léčbě kognitivních symptomů (např. ztráta paměti, zmatenost, a problémy s myšlením a uvažováním) AD [29,30].

U pacientů s AD dochází, převážně v časných stádiích, ke změnám chování a změnám osobnosti, jako jsou: podrážděnost, úzkost, deprese, hněv a agresivita. K zmírnění těchto projevů se používají následující léky: antidepressiva na špatnou náladu a podrážděnost např. citalopram (Celexa), fluoxetin (Prozac) a paroxeine (Paxil), anxiolytika proti úzkosti a neklidu např. lorazepam (Ativan) a oxazepam (Serax), antipsychotika proti halucinacím, bludům a agresi např. aripiprazolu (Abilify), klozapin (Clozaril) a haloperidol (Haldol) [30].

V současné době se vyvíjí léky, které by omezovaly ukládání A β nebo proteinu tau v mozkové tkáni. Cílem je chránit neuronové populace a podporovat vznik synapsí a neurogenezi. Testují se léky, které by snižovaly A β akumulaci. Mezi ně patří anti-agregující molekuly, které blokují oligomery a vlákna, regulátory štěpení APP působící tak, že blokují β - nebo γ - sekretázu, léky zvyšující degradaci A β (např. dodáním neprilysinu (NEP) a insulysin (IDE)), léky blokující signální dráhy a receptory, které aktivují tvorbu neurotoxických oligomerů (např. Fyn kinasa, inhibitory glykogen-syntáza kinázy-3 β (GSK3 β) a cyklin-dependentní proteinová kinázy 5 (CDK5) a další [10].

Studie léčiv působících proti kumulaci proteinu tau je také důležitým cílem. Pomocí např. lithia dochází ke snížení syntézy nebo snížení fosforylace proteinu tau [10].

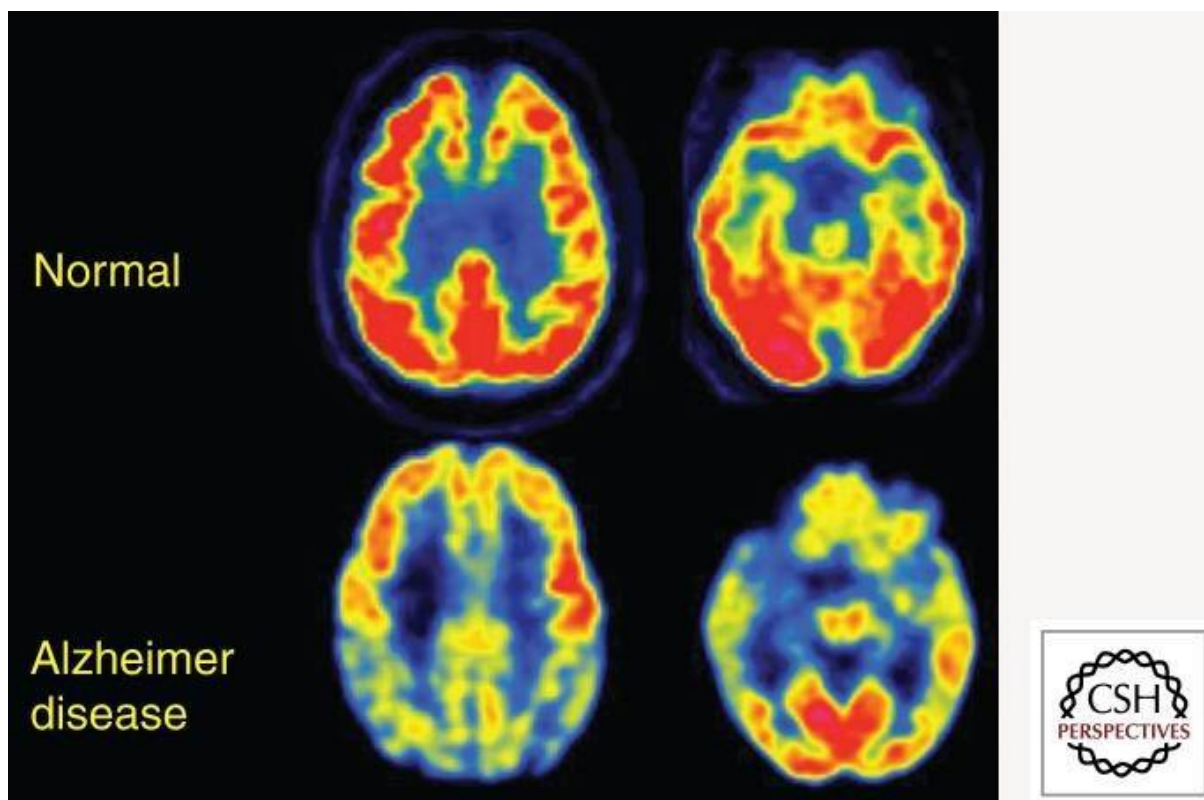
Pokud nejsou pacienti s AD včas léčeni, má AD velké osobnostní a ekonomické následky z hlediska společenského ale i z hlediska fungování rodiny [9].

4. Diagnostika Alzheimerovy choroby

Mnoho vědců se zajímá o to, jak levně a spolehlivě diagnostikovat AD dříve a s větší přesností. Některé výzkumy se zaměřují na osobnostní změny a kognitivní funkce, další studie se zabývají poškozením mozku a vnějšími klinickými příznaky. Vědci také sledují změny v krvi a v mozkomíšním moku, které mohou naznačovat vznik AD. Kromě toho vyvíjí zobrazovací systémy, které by pomohly zjistit i drobné změny ve struktuře mozkové tkáně [16].

V klinickém hodnocení AD se běžně používá počítačová tomografie (CT) a magnetická rezonance (MR). Především se používají k vyloučení jiných typů neurodegenerativních chorob. Rozšířená kortikální atrofie s řidnutím mediálních temporálních laloků jsou nejčastější zobrazované nálezy u pacientů s AD, ale nejsou to nálezy patognomické, může se jednat o projev normálního stárnutí. Magnetická rezonance se používá ke zkoumání atrofií v entorhinální, perirhinální a temporální kůře. Objemové změny pozorovatelné magnetickou rezonancí jsou v souladu s progresí AD a závažnost objemové ztráty souvisí se závažností onemocnění. Absence kortikální atrofie nebo změn v mediálním temporálním laloku není dostatečná k vyloučení diagnózy AD. Strukturální změny jsou patrné až později v průběhu onemocnění. To podněcuje rozvoj a zdokonalování více sofistikovaných kvantitativních metod, které jsou schopny odhalit jemné změny v průběhu času [29,32,33].

Moderní funkční zobrazovací techniky, jako je pozitronová emisní tomografie (PET), jednofotonová emisní tomografie (SPECT), magnetická rezonance spektroskopie (MRS), funkční MRI, magnetická encefalografie (MEG) sledování mozkového metabolismu s fluoro-deoxy-D-glukózy (FDG) a Pittsburgh Compound-B (PIB) zobrazují nejen, zda jedinec trpí určitou formou demence, ale umožňují také nahlédnout do mechanismů synaptického selhání a neurodegenerace. Na rozdíl od strukturálních zobrazovacích metod mají funkční zobrazovací metody schopnost rozpoznat jemné patofyziologické změny v mozkové tkáni a vlastní tedy větší potenciál k určení přesné a včasné diagnózy, sledování progresu onemocnění a léčbu [17,29,33].



Obrázek č. 4: *Transaxiální FDG-PET obrazy normálních kontrolních jedinců a pacientů s mírnou formou AD [33].*

Diagnóza pravděpodobné AD vyžaduje vyloučení dalších neurodegenerativních onemocnění spojených s demencí, jako frontotemporální demence, Parkinsonova choroba, onemocnění s Lewyho tělísky, Creutzfeldt-Jakobova choroba a mozkové autosomálně dominantní arteriopatie. Také je třeba vyloučit poškození v důsledku deprese, chronické intoxikace drogami, chronické infekce centrálního nervového systému, onemocnění štítné žlázy a vitaminové nedostatky (např. B12, thiamin) [19].

Odlišení AD od jiných typů demencí je někdy obtížné a nepřesné a obvykle se provádí pomocí klinické anamnézy a klinického vyšetření a někdy lze také stanovit diagnózu pouze vyloučením jiných typů demence. Liší se zejména mírou a rychlostí projevu příznaku a jak rychle nemoc progreduje [16,17].

Během života pacienta lze nemoc diagnostikovat na základě duševních a behaviorálních symptomů, fyzikálního vyšetření, neuropsychologických testů a laboratorních vyšetření [16].

V současné době je možné definitivní diagnózu AD určit pouze při pitvě. Zjišťuje se počet dvou charakteristických lézí: amyloidních plaků a NFTS [9].

4.1. Biomarkery

V nejširším slova smyslu je biomarker nějaká měřitelná biologická funkce, které lze použít k diagnostice choroby, nebo napomáhá určit, zda nedochází k některým patologickým změnám. Ideální biomarker by měl poskytnout informaci o riziku onemocnění dlouho před nástupem prvních příznaků. Kromě toho by analýza biomarkeru měla být levná, časově nenáročná bez potřeby speciálních klinik. A konečně by ideální biomarker měl být měřitelný ve snadno dostupném biologickém materiálu pacienta [9,21,23].

U neurodegenerativních onemocnění biomarkery napomáhají odhalit časná stadia nemoci, prognózu onemocnění a hodnocení rizika vzniku onemocnění. Biomarkery s dobrou diagnostickou specifičností slouží výzkumníkům k rozlišení jedinců s preklinickou a pravděpodobnou diagnózou od osob, které nemají AD patologii nebo mají jiné neurodegenerativní poškození. Diagnostický marker pro AD by měl odrážet hlavní patologický proces nemoci, tedy degeneraci neuronů a jejich synapsí způsobenou charakteristickými lézemi senilními plaky a NFTS [9,28,34,35].

Pro diagnostiku AD se spoléháme na 3 skupiny vyšetření: 1) analýza CSF (mozkomíšni mok) případně plné krve spolu s průkazem specifických biomarkerů jako je A β , protein tau a případně další doposud nevalidované molekuly. 2) Zobrazovací techniky během života pacienta spolu s histologickými preparáty *post mortem*. 3) Behaviorální a kognitivní testy.

Dále v textu se zaměřím na definici a charakteristiku biochemických markerů. CSF je velmi užitečná kapalina pro AD diagnózu, protože odráží metabolické procesy v mozku díky přímému kontaktu mezi mozkem a CSF. Pro rutinní diagnózu AD z CSF má několik nevýhod: lumbální punkce a odběr mozkomíšního moku je invazivní léčba s potenciálními vedlejšími účinky, screening pacientů je často obtížný a následné analýzy téhož pacienta v průběhu několika let jsou problematické [36]. Biomarkery pro AD v CSF měřené metodou ELISA jsou A β 1-42, celkový tau (t-tau) a fosfo-tau (p-tau) v pozici 181. Pouze kombinace těchto tří biomarkerů CSF výrazně zvyšuje diagnostickou přesnost pro AD, který dává dohromady citlivost > 95% a specifitu > 85% [37]. Také některé techniky pozitronové emisní tomografie mohou zobrazit NFTS přímo na živých pacientech, ale jsou drahé a s omezenou dostupností. Je potřeba zaměřit se na výzkum biomarkerů také v jiných tělních tekutinách [36,37].

Měření v plazmě nebo séru je zlatým standardem na klinikách, protože odběr je minimálně invazivní, ve srovnání s CSF. Metoda měření biomarkerů AD v krvi by splňovala kritéria screeningové metoda. Pomohla by rychleji a včas určit diagnózu AD a zvýšila by se tak úroveň péče o pacienty [23,37].

Plazmatické a sérové biochemické markery navržené pro AD sledují patofyziologické procesy, jako je tvorba amyloidního plaku ($A\beta$), vznik zánětu (cytokiny), oxidační stres (vitamín E), metabolismus lipidů (apolipoprotein E, 24S-hydroxycholesterol) a cévní onemocnění (homocystein, lipoprotein (a)) [38]. Nejlépe prozkoumanou biomarkrem v plazmě je zatím $A\beta$, ale výsledky jsou doposud rozporuplné [39].

U všech onemocnění je v lidském séru zvýšené množství protilátek. Tohoto poznatku využili Nagele a kol. (2011) a zjistili, že zvýšené množství protilátek je i v séru pacientů s neurodegenerativními chorobami. Pomocí vysokoúčinné proteinové *microarray* technologie určili panel 10 autoproti látek, které jsou specifické pro pacienty s AD a to s 96,0% citlivostí a 92,5% specifitou [40].

I přes mnoho studií zabývajících se krevními markery AD nebyl dodnes validován spolehlivý biomarker, pomocí kterého by lékaři mohli jednoznačně diagnostikovat AD [23,36,37].

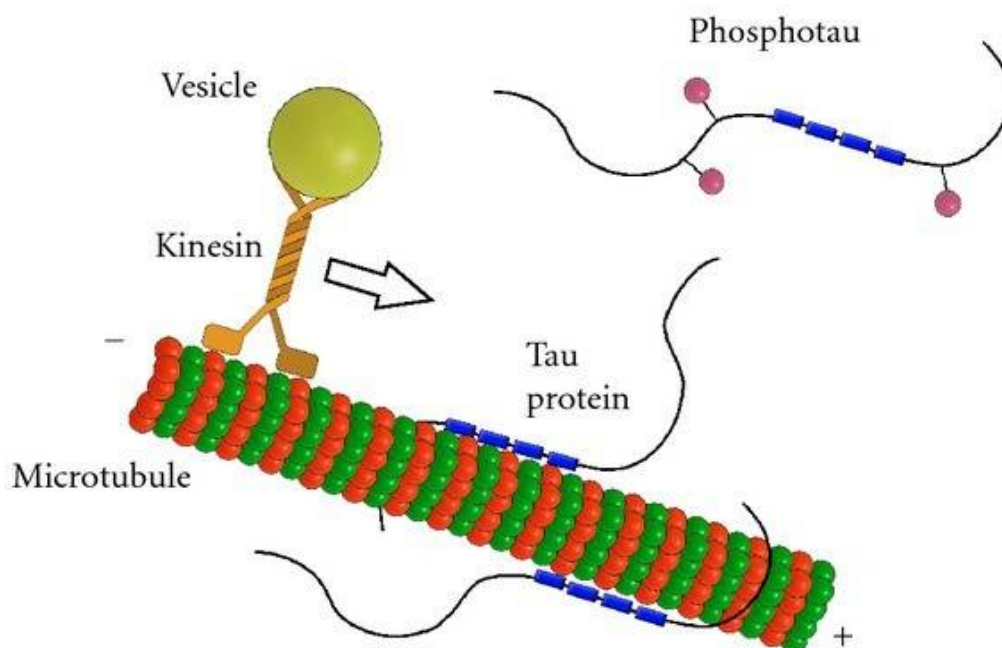
Imunoanalytické stanovení t-tau, p-tau a A β 42 v CSF				
	Typ metody	specifita	protilátka	průměrná změna (% z kontrol)
T-tau				
	ELISA	T-tau	AT120 + Pab	navýšení
	ELISA	T-tau	AT120 + HT7/BT2	navýšení (průměrně o 300%)
	ELISA	T-tau	16B5 + 16G7	navýšení (průměrně o 200%)
	Mikroskopická ELISA	T-tau	Pab-ht2 + Mab F-F11/F-H5	navýšení (216%)
P-tau				
	ELISA	P-tau 181 + P-tau 231	AT180/AT270 + HT7/AT120	navýšení (348%)
	ELISA	P-tau 231 + P-tau 235	Mab anti-tau + anti-tau PT231PS235	navýšení (není uvedena průměrná hodnota)
	ELISA	P-tau 199	Mab anti-tau + anti-PS199	navýšení (2-300%)
		P-tau 231	Tau1/CP27 + CP9	navýšení
	ELISA	P-tau 181	HT7 + AT270	navýšení (2-300%)
	ELISA	P-tau 369 + P-tau 404	PAb92e + PHF-1	navýšení (346%)
A β 42				
	ELISA	A β 1-42	BAN-50 + BC-05	pokles (průměrně o 50%)
	ELISA	A β 1-42	21F12 + 3D6	pokles (průměrně o 50%)
	ELISA	A β X-42	266 + PAb277-2	pokles (průměrně o 50%)
	ELISA	A β X-42	BNT-77 + BC-05	pokles (průměrně o 50%)
	ELISA	A β X-42	WO-2 + G2-11	navýšení (161%)
	ELISA	A β X-42	6E10 + PAb164	pokles (32%)
	ELISA	A β X-42	4G8 + PAb44-344	pokles (37%)
	Western blot	A β X-42	G2-11	pokles (43%)
	Imunoprecipitation + Western blot	A β X-42	G2-11	pokles (39%)
	SDS-PAGE s močovinou + Western blot	A β X-42	n.	pokles (50%)
	SELDI-TOF	A β X-42	n.	pokles (71%)

Tabulka č. 1: *Imunoanalytické stanovení t-tau, p-tau a A β 42 v CSF* [převzato a modifikováno z 34].

T-tau (total tau), p-tau (fosforylovaný tau), A β 42 (amyloid β 1-42), n. (nepoužívá se)

4.1.1. Protein tau

Tau protein je cytoplazmatický mikrotubulární protein hojně se nacházející v neuronových axonech [34,41], který se podílí na sestavení a stabilizaci mikrotubulů [27,28].

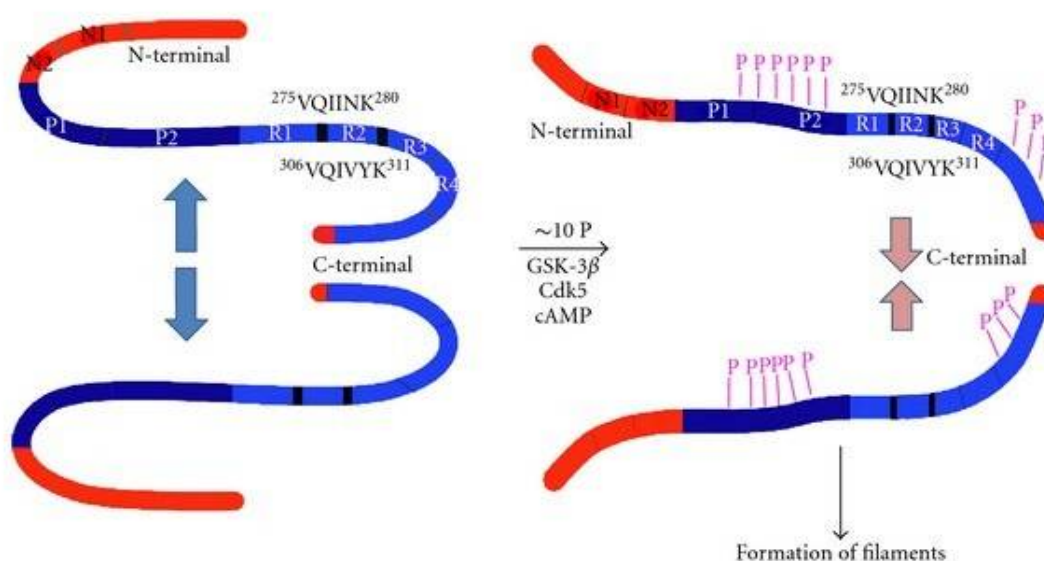


Obrázek č. 5: *Fyziologická funkce proteinu tau – stabilizace mikrotubulů* [42].

Tau je fosfoprotein, s více než 30 potenciálními místy fosforylace [27,34], C.-X. Gong a K. Iqbal (2008) uvádí více než 40 lokalit fosforylace [43]. Fosforylace probíhá obvykle na serinových a treoninových aminokyselinových zbytcích a způsobí oddělení proteinu tau od mikrotubulů a tím jejich destabilizaci [28,36]. Za normálních podmínek jsou obě formy tau - fosforylovaná i defosforylovaná v rovnováze. Převažuje-li fosforylovaná forma, dochází k agregaci tau proteinu do šroubovitých vláken v tělech neuronů (perikaryu) vedoucí k tvorbě neurofibrilárních klubek (NFTS) [28].

Fyziologická úroveň fosforylace tau proteinu je důsledkem dynamické regulace kináz a fosfatáz. Mezi hlavní tau kinázy patří glykogen-syntáza kináza-3 β (GSK3 β), cyklin-dependentní proteinová kináza 5 (CDK5) [38], cAMP závislá protein kináza (PK) a stresovými faktory aktivované kinázy. Proteinové fosfatázy PP mají obvykle široká substrátová specifika a fosfatáza PP2A je nejdůležitější tau fosfatázou vůbec. Příčiny

nadměrné fosforylace proteinu tau nejsou doposud známy, jednou z možností je chyba v regulaci enzymu PP2A [43].



Obrázek č. 6: Fosforylace tau proteinu [42].

Koncentrace t-tau v mozkomíšním moku u zdravého člověka je asi 300 ng/l, u pacienta s AD asi 900 ng/l [Blennow K. a Hampel H. (2003), převzato z 36]. Ve velkém množství studií bylo zjištěno v CSF u AD zvýšené množství t-tau i p-tau [36]. U t-tau je zvýšení o dvojnásobek až trojnásobek [32]. Blennow K. a kol. (2001) uvádí zvýšení CSF t-tau cca o 200% až 300% [34].

Alessia M. a kol. (2003) využili monoklonální protilátku AT 270 specifickou pro fosforylovaný na threoninu tau v pozici 181 a pomocí sendvičové ELISA metody naměřili u pacientů s AD hodnoty vyšší (52 ± 19 pg/ml), ve srovnání se zdravými jedinci (27 ± 10 pg/ml) [44].

Zvýšené hladiny t-tau proteinu v CSF pravděpodobně odráží intenzitu poškození neuronů a jejich degeneraci [34], avšak nejsou pro AD specifické. Může se jednat také o MIC, nebo o jiné méně běžné neurodegenerativní onemocnění [31,34]. I když zvýšená hladina CSF p-tau se jeví jako poměrně specifická pro AD [9]. Zvýšení hladin v CSF p-tau koreluje se zatížením NFTS [9]. Nicméně není jasné, zda zvýšení hladin CSF není způsobeno zvýšeným uvolňováním tohoto strukturálního proteinu při poškození axonů, dendritů, synapsí a buněčné smrti. To však nemusí být spojeno pouze s AD, ale také

s poraněním hlavy, kdy je část mozkové tkáně poškozená nebo cévní mozkovou příhodou [9].

Fyziologicky je tau vysoce heterogenní protein: v dospělém lidském mozku existuje šest různých tau izoform vznikajících z jednoho genu alternativním sestřihem mRNA [34]. Různorodost je umocněná rozsáhlými post-translačními modifikacemi, včetně fosforylace, glykosylace a oxidace proteinu [36,43]. Jsou dlouhé 352 - 441 aminokyselin s molekulovou hmotností mezi 50 a 65 kDa [34]. Izoformy kde je tau protein fosforylován v pozici 181, 199 a 231 jsou charakteristické pro AD [34]. Mohou být použity k odlišení nemocných pacientů od zdravých a také k vyloučení jiné neurodegenerativní choroby (např. frontotemporální demence (FTD) a demence s Lewyho tělísky) [36].

Byla vyvinuta ELISA metoda [45], kterou měříme pomocí monoklonálních protilátek specifických pro tyto 3 izoformy, jejich koncentrace v CSF. Koncentrace p-tau 181, 231 a 199 jsou u pacientů s AD zvýšené. Při diagnostice mají všechny stejnou senzitivitu, i když p-tau 181 a 231 mohou mít poněkud větší přesnost pro AD ve srovnání s jinými formami demence [23].

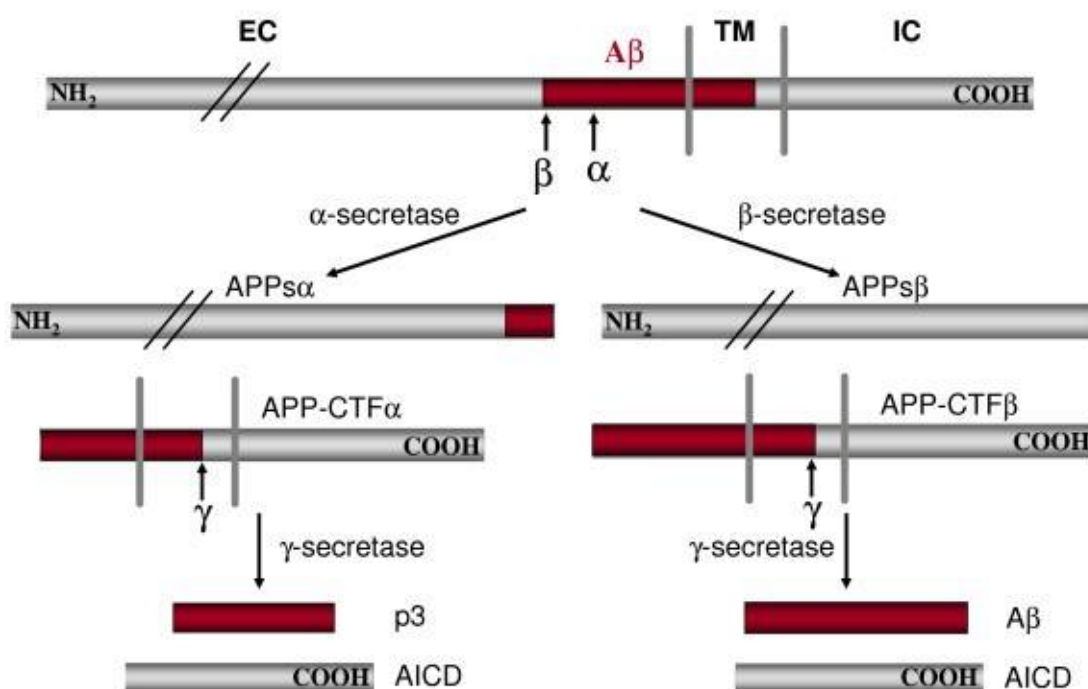
V nedávné studii, bylo využito p-CSF tau 231 k odlišení pacientů s AD a pacientů s jinými neurodegenerativními chorobami s citlivostí 85% a specificitou 97%. Navíc, p-tau 231 výrazně zlepšila diferenciální diagnózu mezi AD a non-AD skupin jedinců, zejména s FTD [45].

Výzkum metod pro analýzu tau v krvi jsou ještě na začátku. Není zcela jasné, jak zvýšené hladiny tau v CSF odpovídají hladinám tau v krvi. Nicméně se předpokládá, že když CSF opouští subarachnoideální prostor a přestupuje přes supachnoideální granulaci do žilního oběhu, mohou produkty z mozku a tím i tau přestoupit z CSF. Tak zatímco původní zprávy o detekci tau v krvi jsou slibné, je zapotřebí další výzkum s cílem využít tyto poznatky k vývoji ověřené metody pro měření tau v krvi [36].

Stanovení proteinu tau v krvi by bylo velkou výhodou a to zejména v klinických studiích. I přes značné úsilí objevit spolehlivé metody k určení hladiny proteinu tau v séru nebo plazmě u pacientů s AD, nebo s jinými neurodegenerativními chorobami, chybí, protože změny v koncentracích proteinu tau v krvi u těchto chorob jsou nepatrné [36,37].

4.1.2. β -amyloid

Amyloid- β je peptid s neznámou fyziologickou funkcí [9] s molekulovou hmotností 4 kDa [28,31]. Většina $A\beta$ je produkována v mozku [9]. Jsou generovány v sekrečních váčcích neuronů [46] tak, že dochází k proteolytickému štěpení APP [11,34,37].



Obrázek č. 7: Schematický diagram štěpení APP [47]

EC – extracelulární, IC – intracelulární, TM – transmembránový, $A\beta$ doména je zvýrazněna červeně.

APP je postupně štěpen dvěma membránově vázanými β - a γ - sekretázami [9,28]. β -sekretáza štěpí APP a uvolňuje se derivát sAPP β . Fragment dlouhý 99 aminokyselin (CTF β) zůstává na membránu vázán. Následně je štěpen γ -sekretázou a vzniká $A\beta$. Štěpení γ -sekretázou je poněkud nepřesné, což vede k C-koncové různorodosti výsledné populace $A\beta$ včetně $A\beta$ 1-37/38/39/40/42 ("Ab kvintet"). Tento heterogenní soubor C-koncových $A\beta$ peptidů lze rozdělit pomocí metody Western blott a nebo SDS-PAGE. $A\beta$ 40 končí valinem a jsou nejhojnější (~ 80 - 90%), následuje $A\beta$ 42 (~ 5 - 10%), který končí alaninem. Mírně delší formy $A\beta$, zejména $A\beta$ 42, jsou více hydrofobní a fibrilogení, a jsou hlavní druhy odpovědné za $A\beta$ agregaci [31].

β -sekretáza štěpí asi 10% z celkové buněčné APP. Zbývající APP, téměř 90 % je štěpeno α -sekretázou, vzniká sAPP α a 83 aminokyselin CTF α . Vzhledem k zásadní roli při vytváření A β , jsou β - i γ - sekretázy považovány za možná cíle pro rozvoj anti-AD léčiv [31].

Za degradaci A β jsou odpovědné dva enzymy neprilysin (NEP) a insulysin (IDE). NEP je plazmatická membránově vázaná metaloproteáza typu II a je zodpovědný za degradaci různých extracelulárních peptidů. IDE je také metaloproteáza a štěpí peptidy extracelulárně i intracelulárně [10]. Značné množství A β zůstává nedegradované, nedochází k prostupu A β přes hemoencefalitickou membránu do oběhu a hromadí se v mozku [31]. Abnormálním hromaděním neurotoxického A β peptidu dochází k tvorbě vysoce nerozpustné agregáty známé jako senilní plaky [11]. To je významným faktorem v rozvoji AD, a je na mysli, že je pravděpodobnou příčinou ztráty paměti a kognitivních funkcí v tomto onemocnění [46].

Diagnózu AD doprovází snížená hladina A β -42 v mozkomíšním moku (CSF) [37] a to asi o 30 - 50% u jedinců, kteří mají klinické příznaky AD, oproti kontrolním nedementním jedincům [9].

Fagan A. a Holtzman D. (2010) prokázali velmi silný opačný vztah mezi hladinou CSF A β 42 a charakterem nálezu amyloidu *in vivo* (měřeno PET). Jejich výsledky prokázaly, že nízká hladina CSF A β 1-42 je výborným biomarkrem depozice kortikálního amyloidu bez ohledu na klinickou diagnózu [9].

Zatímco koncentrace A β 1-40 nebo "A β total" u jedinců s AD jsou podobné jedincům bez projevů demence [34,37]. V důsledku toho je výrazný pokles v poměru A β 42/A β 40 (nebo zvýšení v poměru A β 40/A β 42) v CSF. Jsou potřebné další studie k určení, zda poměr CSF A β 42/A β 40 má větší potenciál než diagnostický CSF A β 42 sám [34]. A β 1-38 se může nacházet v CSF ve zvýšené koncentraci [34].

Alessia M. a kol. (2003) použili sendvičové ELISA ke stanovení A β v CSF. Monoklonální protilátka 21F12 specifická pro volný C-konec A β sloužila k zachycení a monoklonální protilátka 3D6 specifická pro N-konec byla použita pro detekci. Zjistila koncentraci A β 1-42 nižší u pacientů s AD ($0,42 \pm 0,19$ ng/ml) ve srovnání se zdravými jedinci ($0,73 \pm 0,22$ ng/ml) [41]. Hladina A β 42 nekoreluje s mírou progresu onemocnění, ale zůstává stabilní po celou dobu choroby [32].

V několika studiích pomocí metody ELISA zjistili vědci v plazmě zvýšené množství celkového A β nebo A β 1-42 [Schupf N. a kol. (2001), Kosaka T. a kol. (1997), převzato z 38]. V jiných studiích nezjistili významné rozdíly v plazmatických

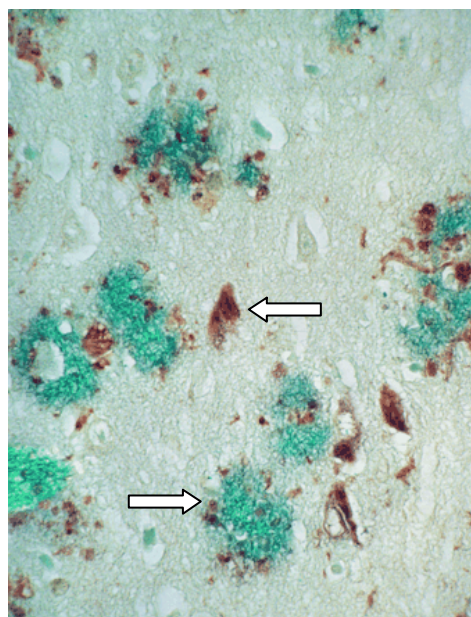
koncentracích A β měřeného u pacientů s AD a u jedinců bez demence [Fukumoto H. a kol. (2003), převzato z 38]. Zvýšená hladina A β může být využita k předpovědi AD. Vysoké plazmatické hodnoty A β jsou rizikovým faktorem vzniku AD [36]. A také se koncentrace A β v plazmě využívá ke sledování účinků léků, které ovlivňují štěpení APP. Například léků, které inhibují β - a γ - sekretázu [38].

Koncentrace A β v plazmě, které by mohly být použity jako diagnostický nález, nebyly doposud validovány [32].

4.1.3. Další potencionální biomarkery

Ubiquitin je malý protein (8,7 kDa) přítomný ve všech buňkách těla a podílí na ATP-dependentní degradaci proteinů. Na poškozené nebo již nepotřebné proteiny se kovalentně vážou molekuly ubiquitinu a slouží jako signál k jejich degradaci pomocí ubiquitin-dependentních proteáz. Bylo prokázáno, že se u pacientů s AD se ubiquitin hromadí v neurofibrilární klubkách i senilních plácích. Pomocí metody ELISA založené na použití monoklonální protilátky 1510, která je specifická pro volný nekonjugovaný ubiquitin, bylo zjištěno u pacientů s AD několikanásobně zvýšené množství ubiquitinu v CSF přímo úměrné neurofibrilárním změnám [34,48].

Obrázek č. 8: Ubiquitin (hnědý) a senilní plak (modrý) [49].



Nedávno byla také kvantifikována β -sekretáza (BACE-1) v CSF. Zvýšené množství BACE-1 v CSF může být využita také jako biomarker v časném stádiu AD a koreluje s úbytkem kognitivních funkcí. Bylo prokázáno, že hladiny BACE-1 v CSF je ovlivněna ApoE genotypem, nejsilnějším genetickým rizikovým vlivem pro AD [9,39].

Některé studie [50] se zaměřily na produkty oxidačního stresu k charakterizaci pacientů s AD. Zvýšené množství isoprostanů v CSF zodpovědných za peroxidaci lipidů může být také využito jako biomarker AD. Nicméně vzhledem k náročné analýze je kvantifikace isoprostanů považována za čistě vědeckou metodu [37]. Jiné studie zjistily nižší úroveň antioxidantů, zejména superoxiddismutázy (SOD), v CSF u pacientů s neurodegenerativní chorobou, včetně AD [50].

Gliové fibrilární kyselé proteiny (GFAP) byly rovněž nalezeny u pacientů s AD ve zvýšeném množství a to až 10x [51].

Pro pacienty s AD je mozková tkáň charakteristická zvýšeným množstvím zánětlivých reakcí, oxidačního stresu a poruchou homeostázy vápníku. Proto jsou v CSF zjištěny zvýšené hladiny některých proteinů vázajících vápník S100 a to S100B a S100A6 a S100A9 a S100A12 [52].

GAP43 (neuromodulin) je protein lokalizovaný v presynaptických terminálních axonech kortikálních neuronů. V mozkové tkáni u pacientů s AD se GAP43 nachází v dystrofických senilních placích. Stanovení hladiny GAP43 lze použít jako biomarker AD. V CSF pacientů s AD se nachází ve zvýšeném množství, ale je však zapotřebí další studie o potenciálu GAP43 jako diagnostického markeru AD [34].

NF proteiny jsou stavební části neuronových axonů, které jsou důležité pro jejich funkci. NF jsou složeny ze tří podjednotek na základě molekulové hmotnosti - vysoká (NF-H), střední (NF-M) a lehká (NF-L). NF-L je lokalizován hlavně ve velkých myelinových axonech. Úroveň NF-L v CSF koreluje s množstvím bílé mozkové hmoty. Proto CSF - NFL může být považován za biomarker degenerace velkých myelinových axonů. Zvýšené hladiny NF-L v CSF jsou uváděny u pacientů s AD, ale také u pacientů s FAD [34].

Další potencionální biomarkery přítomné ve vyšších hladinách u pacientů s AD jsou alfa-1-antitrypsin (A1AT) a alfa-1-antichymotrypsin (A1ACT). Jsou to inhibitory serinové proteázy při zánětu. Zvýšené hladiny A1ACT korelují se závažností patologie a vyvolávají hyperfosforylaci proteinu tau v neuronech [51].

Také potenciální biomarker AD, který se nachází se v CSF je sortilinu příbuzný receptor (SORL1), také známý jako SorLA, nebo LR11. Nachází se u pacientů s AD na rozdíl od zdravých kontrolních jedinců ve sníženém množství [50].

I přes početné studie zaměřené na objev nových biomarkerů v mozkomíšním moku a krvi k dnešnímu dni nebyl žádný nový biomarker pro rutinní diagnostiku validován [33]. Příčinami jsou vysoká variabilita výsledků mezi pacienty v průběhu choroby i volba testovaných pacientů, stádia jejich onemocnění, pohlaví, věk atd.

5. Závěr

Od objevení Alzheimerovy choroby Aloisem Alzheimerem uběhlo už více než 100 let. Vědci se po celou dobu snažili objasnit, jak choroba vzniká, co je její příčinou, jak ji včas diagnostikovat a léčit.

AD je choroba způsobená neurodegenerací mozkové tkáně, ukládáním senilních plaků a neurofibrilárních klubek v mozku. Senilní plaky jsou tvořeny nehromaděním proteinu β -amyloidu v extracelulárních prostorech mozkové tkáně a neurofibrilární klubka intracelulární kumulací hyperfosforylovaného proteinu tau.

Příčiny mohou být genetické predispozice pacientů, např. nosičství genu pro apolipoprotein E na 19. chromozomu. Také se mezi potenciálními příčinami vzniku objevuje vysoká hladina cholesterolu v krvi, vysoký krevní tlak, diabetes mellitus 2. typu, kouření a obezita.

AD je možno diagnostikovat pomocí zobrazovacích metoda (CT, MR, PET, FDG a další), kognitivních a behaviorálních testů, nebo pomocí biomarkerů měřených v CSF nebo krvi pacienta.

V současné době jsou validovány 3 biomarkery měřeny v CSF, které mohou použity k určení běžné klinické diagnózy a to β -amyloid 1-42, t-tau a p-tau 181. Ostatní známé biomarkery např. β -amyloid 231, ubiquitin, nebo β -sekretáza mohou být využity k potvrzení diagnózy AD, zatím jsou tyto biomarkery ve fázi vědeckých studií. Je zapotřebí dalších studií k doplnění škály diagnostických biomarkerů, prokazovaných v CSF nebo i v krvi. Objev charakteristických markerů AD v krvi odebírané méně invazivně než CSF by byl velkým přínosem v diagnostice a léčbě AD.

V současnosti se léčba AD zaměřuje především na oddálení či zmírnění příznaků a na zlepšení kvality života pacienta i jeho okolí. Detailní znalost patogeneze choroby a příčin vzniku degenerativních změn charakteristických pro AD jsou nezbytnou podmínkou pro výzkum a nastavení efektivní léčby či prevence choroby.

6. Použitá literatura:

- [1] Sandra Amor, Fabiola Puentes, David Baker a Paul Van Der Valk. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*. 2010, 129 (2), 154-169. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x>
- [2] Hardy J. a Katrina Gwinn-Hardy. Genetic Classification of Primary Neurodegenerative Disease. *Science*. 1998, 282 (5391), 1075-1079. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.282.5391.1075>
- [3] Henry L. Paulson, Nancy M. Bonini a Kevin A. Roth. Polyglutamine disease and neuronal cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, 97 (24), 12957-12958. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.210395797>
- [4] Genetics Home Reference. Your Guide to Understanding Genetic Conditions. 2008. [online]. [cit.12.3.2012]. Dostupné na: <http://ghr.nlm.nih.gov/>
- [5] Galvine James E., Virginia M.-Y. Lee a John Q. Trojanowski. Synucleinopathies. *Clinical and Pathological Implication*. 2001, 58, 186-190. Dostupné z: <http://www.psychiatry.wustl.edu/Resources/LiteratureList/2001/March/Galvin.pdf>
- [6] Pracovní skupina pro diagnostiku a studium neurodegenerativních onemocnění. [online]. 2004, [cit. 12.3.2012]. Dostupné na: www.neurodegenerace.cz
- [7] Lee Virginia M-Y, Michel Goedert a John Q. Trojanowski. Neurodegenerative tauopathies. *Annual Review of Neuroscience*. 2001, 24 (1), 1121-1159. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.neuro.24.1.1121>
- [8] Goedert M. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1999, 354 (1386), 1101-1118. Dostupné z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.1999.0466>

- [9] Fagan Anne M. a David M. Holtzman. Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomarkers in Medicine*. 2010, 4 (1), 51-63. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/bmm.09.83>
- [10] Crews Leslie a Eliezer Masliah. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*. 2010, 19 (1), 12-20 Dostupné z: <http://www.hmg.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/hmg/ddq160>
- [11] Galimberti D. a Scarpini E. Genetics and biology of Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2010, 15 (3), 129-143.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2894648/?tool=pubmed>
- [12] Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*. 2011, 7 (2), 208-244. Dostupné z: [http://www.alzheimersanddementia.com/article/S1552-5260\(11\)000367/fulltext](http://www.alzheimersanddementia.com/article/S1552-5260(11)000367/fulltext)
- [13] Koukolík. F. a Jiránek R. Alzheimerova nemoc a další demence. Vyd. 1. Praha: Grada, 1998, 229 s. OSBN 80-716-9615-3
- [14] ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL: The global voice on dementia. [online]. [cit.20.3.2012]. Dostupné z: <http://www.alz.co.uk/alois-alzheimer>
- [15] Manuel B. Gruber. Alois Alzheimer (1864-1915). *History of neuroscience*. 2003. [online]. [cit.20.3.2012]
Dostupné z: http://www.ibro.info/Pub/Pub_Main_Display.asp?LC_Docs_ID=3445
- [16] Alzheimer's disease research. A program of the American health assistance foundation. [online]. 2000-2012. [cit. 23.3.2012].
Dostupné z: <http://www.ahaf.org/alzheimers/about/>
- [17] Jiránek R. Demence. Vyd. 1. Praha: MAXDORF-JESSENIUS, 1999, 226s. ISBN 80-858-0044-6

[18] Castellani Rudy J., Raj K. Rolston a Mark A. Smith. Alzheimer Disease. *Disease-a-Month*. 2010, 56 (9), 484-546.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011502910000684>

[19] Bekris, L. M., C.-E. Yu, T. D. Bird a D. W. Tsuang. Review Article: Genetics of Alzheimer Disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*. 2010, 23 (4), 213-227.

Dostupné z: <http://jgp.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0891988710383571>

[20] David Glenn Clark. Residual vectors for Alzheimer disease diagnosis and prognostication. *Brain Behavior*. 2011, 1 (2), 142-152. Dostupné z:

<http://doi.wiley.com/10.1002/brb3.19>

[21] Reitz Christiane, Carol Brayne, Richard Mayeux a D. W. Tsuang. Epidemiology of Alzheimer disease: Genetics of Alzheimer Disease. *Nature Reviews Neurology*. 2011, 7 (3),

137-152. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrneuro.2011.2>

[22] National institute of aging. [online]. [cit. 1.4.2012]. Dostupné z:

<http://www.nia.nih.gov/alzheimers>

[23] Barber C. Robert. Biomarkers for Early Detection of Alzheimer Disease. *JAOA*. 2010, 110 (9), 10-15. Dostupné z: http://www.jaoa.org/content/110/9_suppl_8/S10.full

[24] Gouras Gunnar K., Davide Tampellini, Reisuke H. Takahashi a Estibaliz Capetillozarate. Intraneuronal β -amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease: Genetics of Alzheimer Disease. *Acta Neuropathologica*. 2010, 119 (5), 523-541.

Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00401-010-0679-9>

[25] Perl Daniel P. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*. 2010, 77 (1), 32-42.

Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/msj.20157>

[26] Alberto Serrano-Pozo, Matthew P. Frosch, Eliezer Masliah a Bradley T. Hyman. Neuropathological Alternations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine*. 2011, 1-23.

Dostupné z: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/1/1/a006189.full>

[27] Sun Qian a T. Chris Gamblin. Pseudo-hyperphosphorylation Causing AD-like Changes in Tau Has Significant Effects on Its Polymerization. *Biochemistry*. 2009, 48 (25), 6002-6011. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi900602h>

[28] Tarawneh Rawan a David M. Holtzman. Biomarkers in translational research of Alzheimer's Disease. *Neuropharmacology*. 2010, 59 (4-5), 310-322. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390810001085>

[29] Colin L. Masters, Roberto Cappai, Kevin J. Barnham a Victor L. Villemagne. Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics. *Journal of Neurochemistry*. 2006, 97 (6), 1700-1725. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.2006.03989.x/full>

[30] Alzheimer's Association. 2012, [online]. [cit. 6.5.2012]. Dostupné z: <http://www.alz.org/index.asp>

[31] Muchy M. Paul a Harry Levine. Alzheimer's Disease and the Amyloid- β Peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010, 19 (1), 311-323. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2813509/>

[32] Thal Leon J., Kejal Kantarci, Eric M. Reiman, William E. Klunk, Michael W. Weiner, Henrik Zetterberg, Douglas Galasko, Domenico Patricó, Sue Griffin, Dale Schenk a Eric Siemers. The Role of Biomarkers in Clinical Trials for Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease*. 2006, 20 (1), 6-15.

Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>

[33] Keith A. Johnson, Nick C. Fox, Reisa A. Sperling a William E. Klunk. Brain Imaging in Alzheimer Disease. *Cold spring harbor perspectives in medicine*. 2012, 2 (4), Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312396/?tool=pmcentrez>

[34] Blennow Kaj. Cerebrospinal Fluid Protein Biomarkers for Alzheimer's Disease. *NeuroRx*. 2004, 1 (2) 213-225.

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC534929/>

[35] Niels Andreasen, Lennart Minthon, Pia Davidsson, Eugene Vanmechelen, Hugo Vanderstichele, Bengt Winblad a Kaj Blennow. Evaluation of CSF-tau and CSF-A β 42 as Diagnostic Markers for Alzheimer Disease in Clinical Practice. *Arch Neurol*. 2001, 58 (3), 373-379. Dostupné z:

<http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?volume=58&issue=3&page=373>

[36] Hampel Harald, Kaj Blennow, Leslie M. Shaw, Yvonne C. Hoessler, Henrik Zetterberg a John Q. Trojanowski. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*. 2010, 45 (1), 30-40. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0531556509002071>

[37] Humpel Christian. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends in Biotechnology*. 2011, 29 (1), 26-32.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779910001605>

[38] Irizarry Michael C. Biomarkers of Alzheimer Disease in Plasma. *NeuroRx*. 2004, 1 (2), 226–234. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC534932/>

[39] Hampel Harald, Karl Broich, Yvonne Hoessler a Johannes Pantel. Biological markers for early detection and pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 2009, 11 (2), 141–157. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3181918/?tool=pmcentrez>

[40] Eric Nagele, Min Han, Cassandra DeMarshall, Benjamin Belinka a Robert Nagele. Diagnosis of Alzheimer's Disease Based on Disease-Specific Autoantibody Profiles in Human Sera. *PLoS ONE*. 2011, 6 (8).

Dostupné z: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0023112>

[41] Whittington Robert A., László Virág, François Marcouiller, Marie-Amélie Papon, Noura B. El. Khoury, Carl Julien, Françoise Morin, Charles W. Emala, Emmanuel Planel a Cheng-Xin Gong. Propofol Directly Increases Tau Phosphorylation. *PLoS ONE*. 2011, 6(1). Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0016648>

[42] Kolarova Michala, Francisco Gacia-Sierra, Ales Bartos, Jan Ricny a Daniela Ripova. Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2012, 2012, 1-13.

Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijad/2012/731526/>

[43] C.-X. Gong and K. Iqbal. Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer Disease. *Curr Med Chem*. 2008, 15(23), 2321–2328.

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2656563/?tool=pmcentrez>

[44] Maddalena A. Biochemical Diagnosis of Alzheimer Disease by Measuring the Cerebrospinal Fluid Ratio of Phosphorylated tau Protein to -Amyloid Peptide 42. *Archives of Neurology*. 2003, 60 (9), 1202-1206. Dostupné z: <http://archneur.ama-assn.org/cgi/doi/10.1001/archneur.60.9.1202>

[45] Hampel H. Measurement of Phosphorylated Tau Epitopes in the Differential Diagnosis of Alzheimer's Disease: A Comparative Cerebrospinal Fluid Study. *Archives of General Psychiatry*. 2004, 61 (1), 95-102.

Dostupné z: <http://archpsyc.ama-assn.org/cgi/doi/10.1001/archpsyc.61.1.95>

[46] Hook Vivian, Israel Schechter, Hans-Ulrich Demuth a Gregory Hook. Alternative Pathways for Production of Beta-Amyloid Peptides of Alzheimer's Disease. *Biol Chem. Author manuscript*. 2008, 8 (389), 993–1006. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654319/>

[47] Zheng Hui a Edward H. Koo. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular Neurodegeneration*. 2006, 1 (1).

Dostupné z: <http://www.molecularneurodegeneration.com/content/1/1/5>

[48] Rodney T. Miller. Ubiquitin Immunohistochemistry in Alzheimer's Disease. ProPath. [online]. 2002. [cit. 2.6.2012]. Dostupné z: <http://www.propath.com/newsletters-immunohistochemistry-173/157-august-2002-ubiquitin-immunohistochemistry-in-alzheimers-disease>

[49] Kumar-Singh S., Emmanuel Sturchler, Stefan W. Vetter, Francesca Tarantini, David Simoni, Samuele Baldasseroni a Niccolò Marchionni. Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma 42-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated Abeta42 in Alzheimer's disease: From Central Nervous System to Periphery?. *Human Molecular Genetics*. 2010, 9 (18), 2589-2598. Dostupné z: <http://www.hmg.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/hmg/9.18.2589>

[50] Enrico Mossello, Elena Ballini, Anna Maria Mello, Francesca Tarantini, David Simoni, Samuele Baldasseroni a Niccolò Marchionni. Biomarkers of Alzheimer's Disease: From Central Nervous System to Periphery?. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2011, 2011 (1), 1-7. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijad/2011/342980/>

[51] Seema Patel, Raj J. Shah, Paul Coleman a Marwan Sabbagh. Potential Peripheral Biomarkers for the Diagnosis of Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2011, 2011 (1), 1-9. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijad/2011/572495/>

[52] Estelle Leclerc, Emmanuel Sturchler a Stefan W. Vetter. The S100B/RAGE Axis in Alzheimer's Disease. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*. 2010, 2010 (1), 1-11. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/cpn/2010/539581/>