

Alzheimerova bolest: od molekularnog mehanizma do rane dijagnoze

Alzheimer's disease: from molecular mechanism to early diagnosis

Martina Malnar¹, Marko Košiček¹, Silva Hećimović*

Grupa za istraživanje neurodegenerativnih bolesti, Zavod za molekularnu medicinu, Institut "Ruđer Bošković"

¹Ovi autori jednako su pridonijeli izradi članka.

Primljeno: 25. 3. 2009.

Prihvaćeno: 28. 5. 2009.

Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Silva Hećimović,

Grupa za istraživanje neurodegenerativnih bolesti, Zavod za molekularnu medicinu, Institut "Ruđer Bošković",
Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb
e-mail: silva.hecimovic@irb.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

SAŽETAK. Alzheimerova bolest (AB) najčešći je oblik demencije. Iako je prošlo već sto godina od otkrića bolesti kao i otkrića glavnih patoloških lezija u mozgu bolesnika s AB, senilnih plakova i neurofibrilarnih snopića, još uvijek ne postoji primjerena terapija koja bi liječila bolest, usporila njenu progresiju ili spriječila njezin nastanak. S obzirom na to da promijenjen metabolizam prekursora proteina amiloid- β (APP) i promijenjena razina peptida amiloid- β (A β) predstavljaju glavni uzrok nastanka Alzheimerove bolesti, razumijevanje njihovog mehanizma nastanka i razgradnje važno je za razvoj novih oblika liječenja ove bolesti. Razvoj novih dijagnostičkih metoda koje će omogućiti rano i točno otkrivanje AB stoga je izuzetno važan. Smatra se da će razvoj bilo kojeg oblika intervencije AB imati najznačajniji učinak u najranijoj fazi bolesti kada promjene u mozgu nisu još tako značajne. Analiza razine triju proteina u likvoru (A β 42, ukupnog tau i fosforiliranog oblika proteina tau) za sada je dala najbolje rezultate te je pokazala da se ovim testom mogu diferencijalno dijagnosticirati osobe s AB, kao i nede-mentne osobe te osobe s blagim kognitivnim poremećajem koje će u budućnosti napredovati u AB, stoga je cilj istraživanja biomarkera utvrditi promjene koje će otkriti AB u njoj najranijoj fazi. Nadamo se da će različiti aspekti istraživanja Alzheimerove bolesti pridonijeti razvoju novih oblika liječenja i/ili prevencije ove još uvijek neizlječive bolesti.

Ključne riječi: amiloid- β , demencija, dijagnosticiranje, likvor, tau

ABSTRACT. Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. Although the disease and its main pathological features, senile plaques and neurofibrillary tangles, have been discovered over 100 years ago, there is still no adequate therapy that would treat, slow progression or prevent the genesis of Alzheimer's disease. Since altered metabolism of the β -amyloid precursor protein (APP) and altered formation of amyloid- β peptide (A β) play a central role in the pathogenesis of Alzheimer's disease, understanding their mechanism of formation and clearance is important for designing new therapies for AD. Development of novel diagnostic methods that will enable early and accurate diagnosis of AD is of high importance. It is estimated that any new intervention against AD will have its greatest effect if applied early in the pathogenesis of the disease, when the brain is not that much affected. Analysis of the three proteins in the cerebrospinal fluid (CSF) (A β 42, total tau and phospho-tau) gave the best results until now and showed that this test could be used for differential diagnosis of AD as well as for diagnosis of non-demented individuals and mildly cognitively impaired (MCI) individuals who will progress to AD in the future. Thus, the goal of the biomarker research is to identify changes that will diagnose AD in its earliest stage. We hope that different aspects of research on AD will generate novel therapies and/or will help in preventing Alzheimer's disease.

Key words: amyloid- β , cerebrospinal fluid, dementia, diagnosis, tau

UVOD

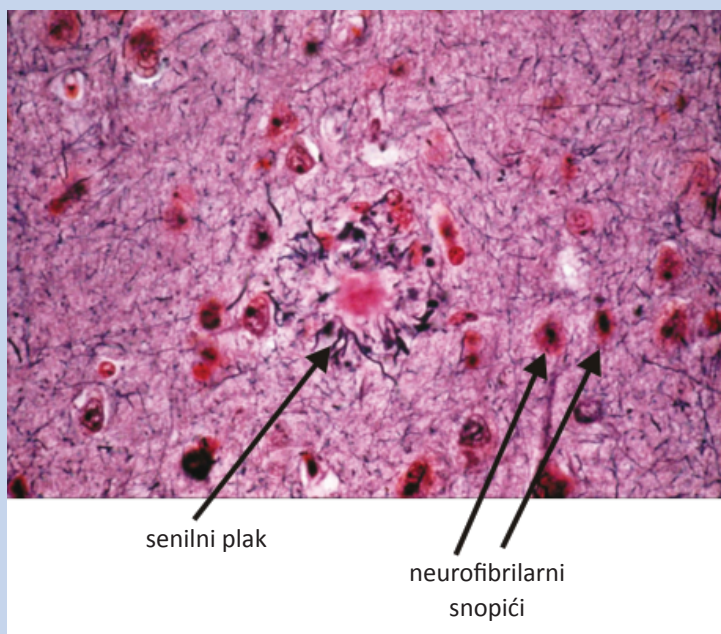
Prije stotinjak godina dr. Alois Alzheimer opisao je prvi slučaj bolesti koja je kasnije i nazvana po njemu, Alzheimerova bolest (AB). Tada je iznio i tipične kliničke simptome poput poremećaja u pamćenju, ali i neuropatološku sliku koja je uključivala senilne plakove (engl. *senile plaques*) i neurofibrilarne snopiće (engl. *neurofibrillary tangles*) koji predstavljaju karakteristične patološke lezije koje se mogu pronaći *post mortem* na histološkim preparatima moždanog tkiva bolesnika s Alzheimerovom bolesti (slika 1). S obzirom na sve veći broj oboljelih osoba od AB, za koju još uvijek ne postoji adekvatno liječenje, a terapija se svodi na smanjenje simptoma bolesti, istraživanja Alzheimerove bolesti su od neobično važne jer imaju za cilj razvoj novih oblika liječenja, smanjenje progresije bolesti i/ili sprječavanje nastanka ove, za sada još uvijek neizlječive bolesti. Pretpostavlja se kako svakih pet godina broj oboljelih od AB naraste za 12%. S obzirom na to, bilo koji oblik intervencije koji bi barem malo usporio progresiju Alzheimerove bolesti imao bi ogroman učinak na javno zdravstvo uopće. U ovom ćemo se preglednom članku stoga kratko osvrnuti na epidemiologiju, genetsku osnovu i molekularne mehanizme nastanka AB, kao i na nove mogućnosti dijagnosticiranja i otkrivanja biomarkera Alzheimerove bolesti.

EPIDEMIOLOGIJA I ČIMBENICI RIZIKA ALZHEIMEROVE BOLESTI

Alzheimerova bolest najučestaliji je oblik demencije te čini oko 60% svih slučajeva demencije. Prevalencija demencija je ispod 1% u osoba starih do 65 godina, a pokazuje gotovo eksponencijalan rast sa starošću, tako da u populacijama Zapada kod ljudi starijih od 85 godina raste na 24% i 33%. Procijenjeno je kako trenutno u svijetu oko 26 milijuna ljudi ima Alzheimerovu bolest; 7.2 milijuna u Europi, 5 milijuna u Americi, 1.3 milijuna u Africi i 13.5 milijuna u Aziji¹. Pretpostavlja se da će se broj oboljelih od AB zbog sve duljeg životnog vijeka udvostručavati svakih 20 godina te da će 2040. godine broj oboljelih doseći 81 milijun¹. Osim starenja, epidemiološke studije su ukazale i na niz drugih čimbenika rizika za AB, poput ozlje-

da mozga, niske mentalne sposobnosti u ranijoj životnoj dobi ili smanjene psihofizičke aktivnosti u starosti^{2,3}. Ostali rizici povezani su s vaskularnim bolestima koje uključuju hiperkolesterolemiju, visoki tlak, aterosklerozu, koronarne bolesti, pušenje, gojaznost i dijabetes^{4,5}. No, mogu li sve te bolesti stvarno uzrokovati AB ili samo pridonose njezinom nastanku, još uvijek nije razjašnjeno. Iako čimbenici okoliša mogu povećati rizik od pojave sporadičnog oblika AB, koji je ujedno i najčešći oblik ove bolesti, pokazalo se kako je za taj

Alzheimerova bolest najučestaliji je oblik demencije za koju nema poznatog lijeka. Niz različitih čimbenika rizika Alzheimerove bolesti uključuje ozljede mozga, niske mentalne sposobnosti u ranijoj životnoj dobi, vaskularne bolesti, aterosklerozu, pušenje, gojaznost, dijabetes i dr. No, još uvijek nije razjašnjeno mogu li sve te bolesti stvarno uzrokovati bolest ili samo pridonose njezinom nastanku.



Slika 1. Prikaz patoloških lezija karakterističnih za Alzheimerovu bolest: senilnih plakova – izvanstaničnih nakupina amiloid- β peptida ($A\beta$) i neurofibrilarnih snopića – unutarstaničnih nakupina hiperfosforiliranog proteina tau. Slika je dijelom preuzeta iz članka Burns A. (LancetNeurol 2009).
Figure 1. Pathological characteristics in the brain of Alzheimer's disease patients: senile plaques – extracellular aggregates of amyloid- β peptide ($A\beta$) and neurofibrillary tangles – intracellular aggregates of hyperphosphorylated tau protein. The figure is partially taken from Burns A. (LancetNeurol 2009).

oblik ipak značajna specifična genetička pozadina. Velika populacijska studija provedena na blizancima pokazala je kako nasljednost sporadičnog oblika AB može biti i do 80%⁶. Ipak, smatra se da je Alzheimerova bolest kompleksna bolest koja nastaje zbog djelovanja nekoliko gena i rizika okoliša.

GENETIČKA OSNOVA ALZHEIMEROVE BOLESTI

Alzheimerova bolest uključuje nasljedne i sporadične oblike bolesti.

GENI UKLJUČENI U NASLJEDNI OBLIK ALZHEIMEROVE BOLESTI

Nasljedna AB prenosi se na autosomno dominantan način, a prvi simptomi javljaju se prije 65. godine starosti. Zbog toga se ovaj oblik bolesti još naziva rani oblik AB (engl. *early-onset Alzheimer's disease* – EOAD). Mutacije u genu za prekursor proteina amiloid- β (*APP*) koji se nalazi na kromosomu 21 prve su otkrivene mutacije koje uzrokuju nasljedni oblik AB⁷. No, mutacije u genu za *APP* odgovorne su za nasljedni oblik AB u svega nekoliko obitelji. Većinu slučajeva nasljednog oblika AB uzrokuju mutacije u genima za presenilin 1 (*PS1*) i presenilin 2 (*PS2*)^{8,9}. Obitelji u kojima se javlja nasljedni oblik AB vrlo su rijetke, te je prevalencija takvog oblika AB ispod 0.1%¹⁰. Otkriće mutacija u genima *APP*, *PS1* i *PS2* pridonijelo je, međutim, razumijevanju molekularnog mehanizma nastanka Alzheimerove bolesti. Zanimljivo je kako više od 200 otkrivenih mutacija u ovim genima ima jednak učinak na povećanje omjera peptida A β 42/A β 40, ukazujući na jedinstven mehanizam nastanka ovog oblika AB.

GENI UKLJUČENI U "SPORADIČNI" OBLIK ALZHEIMEROVE BOLESTI

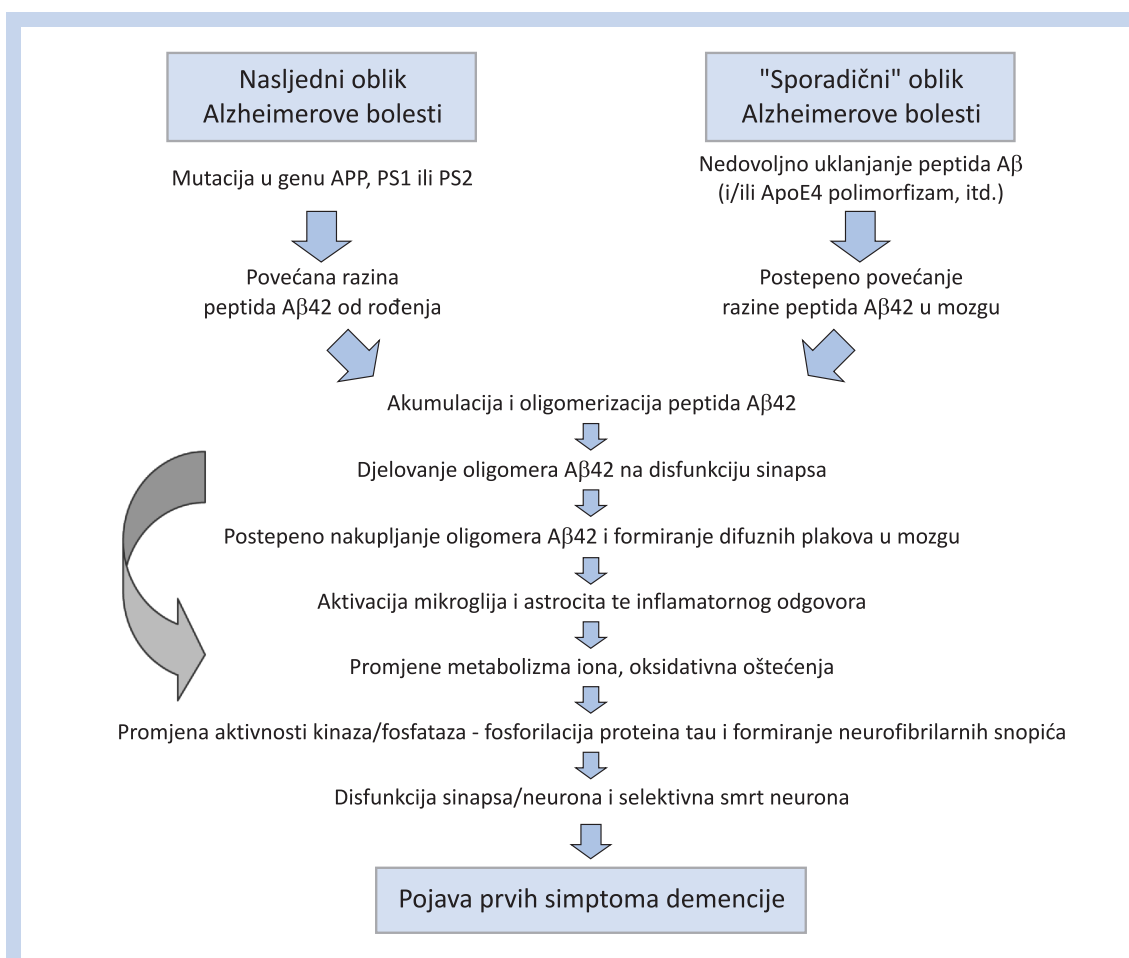
Sporadični oblik AB javlja se nakon 65. godine života te se još naziva kasni oblik AB (engl. *late-onset Alzheimer's disease* – LOAD). Za razliku od nasljednog oblika Alzheimerove bolesti koji je vrlo rijedak, ovaj oblik AB je najčešći. Iako se ovaj oblik AB naziva sporadičnim, novija genetska istraživanja ukazuju na to kako on vrlo vjerojatno nije sporadičan, već se javlja kao posljedica zajedničkog djelovanja nekoliko gena i nekoliko čimbenika rizika te da postoji genetska predisponira-

nost za nastanak ovog oblika AB. Brojne asocijacijske studije kao i *linkage* analize utvrdile su postojanje velikog broja gena koji bi mogli biti uključeni u nastanak ovog oblika AB (www.alzforum.org). Dobiveni se rezultati, međutim, nisu uspjeli ponoviti u studijama na drugim populacijama, što ukazuje na činjenicu kako još uvijek nije utvrđen gen(i) koji bi direktno mogao biti odgovoran za nastanak najčešćeg oblika AB.

Jedini do sada sa sigurnošću utvrđen rizični čimbenik za nastanak sporadičnog oblika AB je polimorfizam ϵ 4 apolipoproteina E (*ApoE*). Dvije populacijske studije iz 1993. godine ukazale su na povezanost između alela ϵ 4 gena za apolipoprotein E (*APOE*) i Alzheimerove bolesti^{11,12}. Dok je ovaj polimorfizam prisutan u 15% zdrave populacije, u grupi AB prisutan je u čak 65% bolesnika. Heterozigoti za ϵ 4 alel imaju tri puta veći rizik nastanka AB, dok se u homozigota taj rizik povećava 15 puta¹³. Osim toga, *APOE4* alel utječe na raniju pojavu simptoma bolesti i to svaka kopija alela za 10-ak godina. Molekularni mehanizmi djelovanja *ApoE* proteina u nastanku AB još uvijek nisu potpuno jasni. *ApoE* ima funkciju u prijenosu kolesterola u mozgu dok je *ApoE4* varijanta tog proteina manje učinkovita od drugih oblika¹⁴. Isto tako, *ApoE* je nuždan za nakupljanje amiloid- β peptida (*A β*) te potiče njegovu agregaciju i stvaranje plakova¹⁵. Treba naglasiti kako polimorfizam *ApoE4* predstavlja samo rizični čimbenik nastanka Alzheimerove bolesti, a ne njegov uzrok, te da predstavlja rizični čimbenik i kod kardiovaskularnih bolesti.

MOLEKULARNI MEHANIZMI NASTANKA ALZHEIMEROVE BOLESTI

Još je dr. Alois Alzheimer opisao mikroskopski malene lezije, tzv. senilne plakove i neurofibrilarne snopiće na histološkim preparatima središnjeg temporalnog režnja i kore moždanog tkiva svoje bolesnice Auguste. Te su promjene, zajedno s degeneracijom živčanih stanica i sinapsa, karakteristične za *post mortem* nalaze u bolesnika s AB. Različiti patološki mehanizmi koji bi mogli biti uzrok takvih promjena bili su predmet prvih istraživanja. Agregacija amiloid- β peptida (*A β*) i njegovo odlaganje u obliku plakova, hiperfosforilacija proteina tau koja rezultira nastankom nakupina



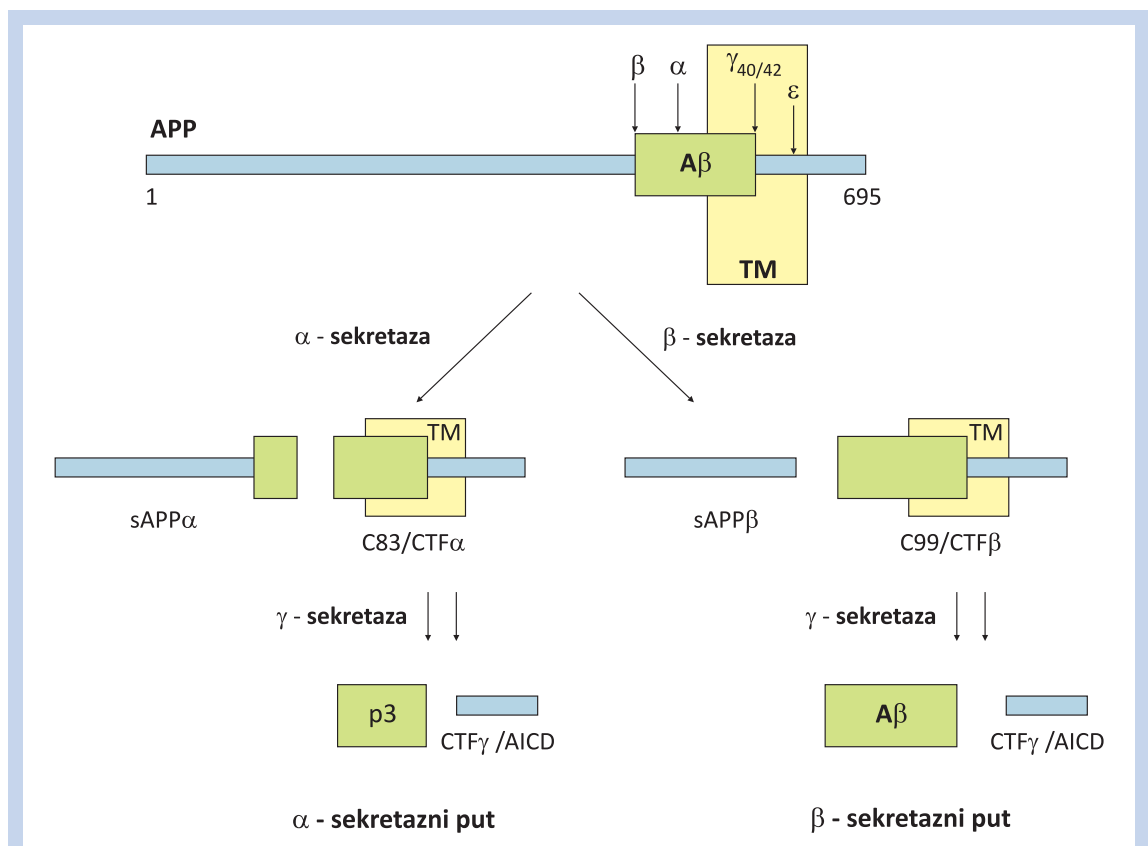
Slika 2. Shematski prikaz slijeda događaja amiloidne hipoteze nastanka Alzheimerove bolesti. Slika je dijelom preuzeta iz www.alzforum.org.

Figure 2. Diagram of the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. The figure is partially taken from www.alzforum.org.

neurofibrilarnih snopića, neurovaskularna disfunkcija, upalni procesi i oksidativni stres neki su od takvih mehanizama.

Hipoteza amiloidne kaskade smatra se vrlo vjerojatnim mehanizmom nastanka Alzheimerove bolesti (slika 2)¹⁶. Ova hipoteza pretpostavlja da peptid amiloid- β (A β) ima središnju ulogu u patogenezi AB, odnosno da je promijenjen metabolizam/razina ovog peptida začetnik kaskade događaja koja u konačnici rezultira neurodegeneracijom i Alzheimerovom bolesti. Sredinom 80-ih godina 20. st. znanstvenici su uspjeli otkriti sekvencu aminokiselina peptida A β koji su izolirali iz plakova¹⁷. Ubrzo je kloniran i gen za prekursor protein amiloid- β (APP) koji kodira transmembranski protein APP od kojeg peptid A β nastaje¹⁸. Prvotno su prevladavala mišljenja da je A β peptid protein koji ne nastaje u "normalnoj" stanici, no istraživa-

nja su pokazala kako je on produkt uobičajenog metabolizma svake stanice¹⁹. Tada su se istraživanja usmjerila k traženju enzima proteaza koje sudjeluju u izrezivanju A β peptida iz proteina APP. Enzimi su nazvani β - i γ -sekretaza (slika 3). γ -sekretaza je membranski kompleks koji se sastoji od četiri proteina: presenilina (PS1 ili PS2), nikastrina, proteina PEN-2 i APH-1, s presenilinom u aktivnom mjestu tog kompleksa²⁰⁻²⁴. β -sekretazu kodira gen BACE1 (od engl. *β -site APP-cleaving enzyme 1*)²⁵. β - i γ -sekretaza sudjeluju u tzv. amiloidogenom putu cijepanja proteina APP u kojem nastaje peptid A β . No, postoji i drugi, neamiloidogeni put, u kojem umjesto β -sekretaze sudjeluje α -sekretaza. Funkciju te treće proteaze obavlja metaloproteaza ADAM10²⁶. U tom putu ne nastaje A β , već kraći peptid p3 koji ne pokazuje tendenciju nakupljanja i stvaranja



Slika 3. Shematski prikaz procesiranja prekursora proteina amiloid-β (APP). Peptid amiloid-β (Aβ), koji se smatra glavnim uzrokom nastanka Alzheimerove bolesti, nastaje cijepanjem proteina APP enzimima β-sekretaza i γ-sekretaza, tzv. β-sekretaznim putem.

Figure 3. Schematic representation of processing of the β-amyloid precursor protein (APP). The amyloid-β peptide (Aβ), which plays a central role in the pathogenesis of Alzheimer's disease, is generated by sequential cleavage of APP by β-secretase and γ-secretase, through the β-secretase pathway.

plakova (slika 3). Promijenjeno procesiranje proteina APP u vidu povećanog stvaranje peptida Aβ smatra se glavnim začetnikom nastanka Alzheimerove bolesti. S tim u vezi, sinteza inhibitora β-/γ-sekretaze jedan je od načina razvoja novih oblika liječenja Alzheimerove bolesti.

U normalnim uvjetima peptid Aβ razgrađuje se i uklanja iz moždanih stanica. Danas među znanstvenicima prevladava hipoteza kako je upravo neravnoteža između proizvodnje i razgradnje/uklanjanja Aβ peptida u mozgu primarni događaj koji naposljetku dovodi do neurodegeneracije i nastanka Alzheimerove bolesti. Tu hipotezu podupiru i činjenice da se mutacije koje uzrokuju nasljedni oblik Alzheimerove bolesti nalaze upravo u genima za prekursor peptida amiloid-β (APP) i ključne enzime (preseniline) za njegov nastanak. Usporedo s hipotezom amiloidne kaskade istraživali su se i uzroci nastanka nakupina neurofibri-

larnih snopića. Otkriveno je kako oni sadrže hiperfosforilirani oblik proteina tau^{27,28}. Protein tau normalan je protein aksona neurona koji se veže na mikrotubule čime potiče njihovo sastavljanje i stabilnost. Hiperfosforilacija proteina tau uzrokuje razgradnju mikrotubula te nakupljanje hiperfosforiliranog oblika proteina unutar stanice zajedno s drugim proteinima vezanim za mikrotubule. Posljedica toga je poremećen transport unutar aksona i naposljetku smetnje u sinaptičkoj funkciji neurona. No, pitanje je li hiperfosforilacija proteina tau i njegovo unutarstanično nakupljanje uzrok ili posljedica Alzheimerove bolesti još uvijek intrigira znanstvenike. Naime, dok je nakupljanje peptida Aβ i stvaranje senilnih plakova specifično za Aβ, nakupljanje i porast fosforiliranog oblika proteina tau prisutno je i u drugim oblicima demencija kao i u drugim neurodegenerativnim bolestima.

NOVE MOGUĆNOSTI DIJAGNOSTICIRANJA I OTKRIVANJA BIOMARKERA ALZHEIMEROVE BOLESTI

Postojeće metode dijagnosticiranja Alzheimerove bolesti (AB) temelje se na neurološkim i neuropsihijatrijskim testovima, *neuroimaging* analizama i isključivanju drugih oblika demencije, što često dovodi do toga da bolest u ranom stadiju ostaje neotkrivena. S druge strane, preparati koji se koriste u liječenju AB uglavnom djeluju simptomatski i najučinkovitiji su u najranijoj fazi bolesti. Zbog toga postoji potreba za otkrivanjem novih načina dijagnosticiranja AB koji bi omogućili nedvojbenu dijagnozu u najranijem stadiju bolesti i omogućili pravovremenu primjenu terapije. Trenutna istraživanja usmjerena su k pronalasku biomarkera koji bi trebali nedvojbenu upućivati na AB, biti pouzdani te jednostavni za analizu. U po-

sljednjih desetak godina objavljeno je mnogo potencijalnih proteinskih biomarkera za AB koje je moguće mjeriti u plazmi. Povećana razina alfa-2-makroglobulina ($\alpha 2M$) i komplement faktora H (CFH)²⁹ te alfa-1-antikimotripsina (A1ACT)^{30,31} pronađena je u plazmi bolesnika s AB u usporedbi sa zdravim kontrolama. Iako se ovi proteini mogu povezati s patološkim procesima koji se događaju u mozgu oboljelih od AB, oni se ne koriste u kliničkoj praksi zbog nedovoljne osjetljivosti i reproducibilnosti metoda detekcije. Za razliku od krvi koja je od mozga odijeljena krvno-moždanom barijerom, cerebrospinalna tekućina (engl. *cerebrospinal fluid* – CSF), tj. likvor, najbolji je odraz patoloških promjena u mozgu zbog stalnog kontakta između mozga i cerebrospinalne tekućine/likvora. Glavni nedostatak likvora kao potencijalnog sustava za dijagnostiku AB je invazivna metoda uzimanja uzorka, odnosno lum-

Tablica 1. Razine triju proteina, ukupnog tau (t-tau), fosforiliranog oblika proteina tau (P_{181} -tau) i peptida amiloid- $\beta 42$ (A $\beta 42$) u likvoru osoba s različitim poremećajima primjenom testa ELISA (Innogenetics, Belgija). Određivanje razine ovih triju proteina u likvoru omogućava diferencijalno dijagnosticiranje Alzheimerove bolesti već u njoj najranijoj fazi.

Table 1. The levels of the three proteins, total tau (t-tau), hyperphosphorylated tau (P_{181} -tau) and amyloid- $\beta 42$ peptide (A $\beta 42$) in the cerebrospinal fluid of individuals with different conditions analyzed by ELISA assay (Innogenetics, Belgium). Note that analysis of the three proteins in the CSF enables differential diagnosis of Alzheimer's disease in the earliest stage of the disease.

	t-tau	P-tau	A $\beta 42$
Alzheimerova bolest	umjereno do značajno povećanje	umjereno do značajno povećanje	umjereno do značajno smanjenje
Starenje	normalno	normalno	normalno
Depresija	normalno	normalno	normalno
Parkinsonova bolest	normalno	normalno	normalno
Alkoholna demencija	normalno	normalno	normalno
Frontotemporalna demencija	normalno do blago povećanje	normalno do blago sniženje	normalno do blago povećanje
Demencija s Lewyjevim tjelešcima	normalno do blago povećanje	normalno	blago do umjereno povećanje
Creutzfeld-Jacobova bolest	izrazito povećanje	normalno, u nekim slučajevima blago/umjereno povećanje	umjereno do značajno smanjenje
Akutni infarkt	povećanje korelira s jačinom infarkta	bez promjene	bez promjene
Vaskularna demencija	kontradiktorni rezultati	normalno	normalno do blago povećanje

balna punkcija. Trenutno najreproducibilniji biomarkeri za rano otkrivanje AB predstavljaju mjerenje razine amiloid- β peptida ($A\beta_{42}$), ukupnog proteina tau (t-tau) te fosforiliranog oblika proteina tau (P_{181} -tau) (tablica 1). $A\beta$ peptid je glavna komponenta senilnih plakova, glavnog neuropatološkog obilježja AB. Postoji više $A\beta$ peptida, a najzastupljeniji su $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$ peptidi. Ispitivanja likvora su pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u ukupnoj količini peptida $A\beta$ između AB bolesnika i kontrola³²⁻³⁴, dok je razina pep-

Različiti aspekti istraživanja Alzheimerove bolesti, osobito globalna istraživanja proteoma i lipidoma oboljelih, mogu pridonijeti razvoju novih oblika liječenja i/ili prevencije. U tom kontekstu istraživanja biomarkera posebno su važna jer imaju za cilj otkriti patološke promjene vezane za nastanak Alzheimerove bolesti u njenoj najranijoj fazi, kada promjene na mozgu još nisu izražene i kada je terapijska intervencija najizglednija.

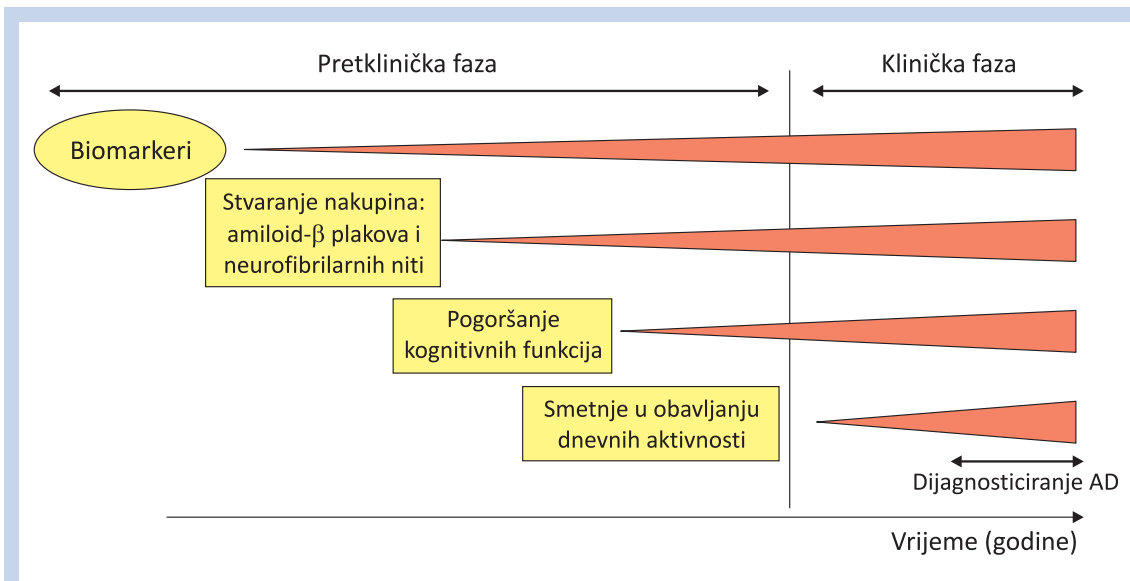
tida $A\beta_{42}$ značajno smanjena u likvoru AB bolesnika³⁵. Ova pojava objašnjena je činjenicom o nakupljanju ovog peptida u mozgu, što smanjuje njegovu difuziju u likvor. Ukupna razina proteina tau (t-tau) smatra se pokazateljem neuronske smrti. Protein tau je unutarstanični protein koji se u likvoru nalazi kao posljedica lize, tj. smrti neurona i difuzije u likvor. Iako povećana razina t-tau u likvoru može ukazivati i na neke druge neuropatološke procese, primjerice Creutzfeld-Jakobovu bolest³⁶, razina P_{231} -tau prema nekim istraživanjima nalazi se u pozitivnoj korelaciji sa stvaranjem neurofibrilnih snopića u mozgu³⁷, jednom od karakterističnih obilježja AB. No, takva korelacija nije utvrđena za P_{181} -tau³⁸, iako je njegova razina u likvoru bolesnika s AB također povećana u odnosu na zdrave kontrole³⁹. Zbog toga povezanost fosforiliranog oblika proteina tau u likvoru s neurodegenerativnim procesima u AB treba pomnije proučiti.

Posebno osjetljiva i specifična metoda za detekciju AB je mjerenje omjera p-tau/ $A\beta_{42}$ u likvoru⁴⁰. Navedena studija dokazala je kako se omjer p-tau/ $A\beta_{42}$ može koristiti za razlikovanje bolesnika s AB od zdravih kontrola (osjetljivost 86%, spe-

cifičnost 96%) te za razlikovanje bolesnika s AB od bolesnika s drugim oblikom demencije (osjetljivost 80%, specifičnost 89%). Ovaj kriterij za diferencijalno dijagnosticiranje AB pokazao se dobrim i u početnoj fazi bolesti³⁹. Bolesnici s blagom AB također imaju smanjenu razinu $A\beta_{42}$ te povećanu razinu p-tau i t-tau u likvoru u odnosu na kontrole, a omjeri t-tau/ $A\beta_{42}$ i p-tau/ $A\beta_{42}$ mogu predvidjeti razvoj demencije kod kognitivno normalnih starijih osoba. Promjene razine ovih triju biomarkera u humanom likvoru kod različitih poremećaja u odnosu na starenja prikazane su u tablici 1.

Osim ovih proteinskih, zanimljivi su i lipidni biomarkeri Alzheimerove bolesti u likvoru. Nekoliko studija dokazalo je kako se u mozgu oboljelih od AB odvijaju specifične lipidne promjene. Primjerice, ukupna razina fosfolipida i sulfatida smanjena je u odnosu na zdrave kontrole⁴¹⁻⁴⁶, dok je razina ceramida i kolesterola povećana^{47,48}, što je posljedica deregulacije metabolizma sfingolipida u mozgu AB bolesnika⁴⁹. Za sada je identificirano preko 450 različitih lipidnih molekula u humanom likvoru, no zbog njihove izrazito niske koncentracije teško ih je precizno kvantificirati te potom odrediti i moguće promjene specifične za bolest. Sato i suradnici⁵⁰ 2005. godine pronašli su značajno povećanje razine ceramida u likvoru bolesnika s AB u odnosu na likvor bolesnika s lateralnom amiotrofičnom sklerozom i ostale neurološke kontrole. Također, povećana razina glicerosfingokolina pronađena je u likvoru bolesnika s AB u usporedbi sa zdravim kontrolama kao i u usporedbi s likvorom bolesnika s vaskularnom demencijom⁵¹. Analiza fosfolipida i drugih lipida, posebno sulfatida i oksidiranih sterola u likvoru, potencijalno bi mogla dovesti do pronalaska novih biomarkera, kako za AB tako i za ostale neurodegenerativne bolesti.

Prednosti biomarkera u otkrivanju i predviđanju nastanka AB je njihova rana detekcija u stadiju bolesti kada klinički simptomi nisu uopće prisutni ili su tek blago izraženi. Budući da je poznato kako prve patološke promjene vezane za Alzheimerovu bolest nastaju 20 – 30 godina prije pojave prvih simptoma bolesti (slika 4), rano otkrivanje bolesti omogućilo bi prevenciju bolesti i/ili primjenu adekvatne terapije s ciljem usporavanja progresije



Slika 4. Biomarkeri – put k ranijoj dijagnozi Alzheimerove bolesti. Novija istraživanja pokazuju kako se prve patološke promjene povezane s nastankom Alzheimerove bolesti javljaju 20 – 30 godina ranije od pojave prvih simptoma bolesti.

Figure 4. Biomarkers – the road to early diagnosis of Alzheimer's disease. Recent reports indicate that the first pathological changes related to the genesis of Alzheimer's disease occur 20-30 years before the onset of the first symptoms.

bolesti. Iako bi krv, odnosno plazma, zbog jednostavnosti uzimanja uzorka bila idealna za praćenje razine biomarkera, trenutne studije pokazuju kako likvor ipak daje najreproducibilnije rezultate. Može se očekivati da će se razvojem tehnologije rana dijagnostika AB temeljiti na kombinaciji proteinskih i/ili lipidnih biomarkera iz plazme, cerebrospinalne tekućine, urina i *neuroimaging* analiza, kako bi se odredio stadij i najbolja metoda liječenja Alzheimerove bolesti.

ZAKLJUČAK

U ovom preglednom članku dali smo kratak osvrt na genetsku osnovu, molekularni mehanizam Alzheimerove bolesti (AB), kao i na nove mogućnosti ranog i točnog dijagnosticiranja bolesti. Istraživanja biomarkera posebno su važna jer imaju za cilj otkriti patološke promjene vezane uz nastanak Alzheimerove bolesti u njenoj najranijoj fazi. Smatra se kako će bilo koji novi oblik intervencije u AB imati najznačajniji učinak u najranijoj fazi bolesti, kada promjene na mozgu još nisu izražene. Analiza razine triju proteina u likvoru (Aβ42, ukupnog tau i fosforiliranog oblika proteina tau) za sada je dala najbolje rezultate te je pokazala kako se ovim testom mogu diferencijalno dija-

gnosticirati osobe s AB, kao i nedementne osobe i osobe s blagim kognitivnim poremećajem koje će u budućnosti razviti AB. Nadamo se da će različiti aspekti istraživanja Alzheimerove bolesti, osobito oni na razini istraživanja proteoma i lipidoma oboljelih, pridonijeti razvoju novih oblika liječenja i/ili prevencije ove još uvijek neizlječive bolesti.

LITERATURA

1. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005;366:2112-7.
2. Jellinger KA. Head injury and dementia. *Curr Opin Neurol* 2004;17:719-23.
3. Mortimer JA, Snowdon DA, Markesbery WR. Head circumference, education and risk of dementia: findings from the Nun Study. *J Clin Exp Neuropsychol* 2003;25:671-9.
4. Luchsinger JA, Mayeux R. Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep* 2004;6:261-6.
5. Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 2003;26:81-104.
6. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63:168-74.
7. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991;349:704-6.

8. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995;375:754-60.
9. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995;269:973-7.
10. Harvey RJ, Skelton-Robinson M, Rossor MN. The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1206-9.
11. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261:921-3.
12. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993;342:697-9.
13. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 1997;278:1349-56.
14. Poirier J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1994;17:525-30.
15. Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadaniyan M, Sartorius LJ et al. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2892-7.
16. Hardy J. Testing times for the "amyloid cascade hypothesis". *Neurobiol Aging* 2002;23:1073-4.
17. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:4245-9.
18. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987;325:733-6.
19. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL et al. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 1992;359:322-5.
20. Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 2003;5:486-8.
21. Wolfe MS, Haass C. The Role of presenilins in gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 2001;276:5413-6.
22. Baulac S, LaVoie MJ, Kimberly WT, Strahle J, Wolfe MS, Selkoe DJ et al. Functional gamma-secretase complex assembly in Golgi/trans-Golgi network: interactions among presenilin, nicastrin, Aph1, Pen-2, and gamma-secretase substrates. *Neurobiol Dis* 2003;14:194-204.
23. Kimberly WT, Xia W, Rahmati T, Wolfe MS, Selkoe DJ. The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem* 2000;275:3173-8.
24. Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6382-7.
25. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999;286:735-41.
26. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasikowski M et al. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3922-7.
27. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:4913-7.
28. Nukina N, Ihara Y. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J Biochem* 1986;99:1541-4.
29. Hye A, Lynham S, Thambisetty M, Causevic M, Campbell J, Byers HL, et al. Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain* 2006;129:3042-50.
30. Maes OC, Kravitz S, Mawal Y, Su H, Liberman A, Mehindate K, et al. Characterization of alpha1-antitrypsin as a heme oxygenase-1 suppressor in Alzheimer plasma. *Neurobiol Dis* 2006;24:89-100.
31. Yu HL, Chertkow HM, Bergman H, Schipper HM. Aberrant profiles of native and oxidized glycoproteins in Alzheimer plasma. *Proteomics* 2003;3:2240-8.
32. van Gool WA, Kuiper MA, Walstra GJ, Wolters EC, Bolhuis PA. Concentrations of amyloid beta protein in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995;37:277-9.
33. Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D et al. Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995;38:643-8.
34. Southwick PC, Yamagata SK, Echols CL, Jr., Higson GJ, Neynaber SA, Parson RE et al. Assessment of amyloid beta protein in cerebrospinal fluid as an aid in the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1996;66:259-65.
35. Sunderland T, Linker G, Mirza N, Putnam KT, Friedman DL, Kimmel LH et al. Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA* 2003;289:2094-103.
36. Otto M, Wiltfang J, Tumani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J et al. Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1997;225:210-2.
37. Buerger K, Ewers M, Pirttila T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ et al. CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 2006;129:3035-41.
38. Buerger K, Alafuzoff I, Ewers M, Pirttila T, Zinkowski R, Hampel H. No correlation between CSF tau protein phosphorylated at threonine 181 with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 2007;130:1-2.
39. Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol* 2007;64:343-9.

40. Maddalena A, Papassotiropoulos A, Muller-Tillmanns B, Jung HH, Hegi T, Nitsch RM et al. Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to beta-amyloid peptide. *Arch Neurol* 2003;60:1202-6.
41. Cheng H, Xu J, McKeel DW, Jr, Han X. Specificity and potential mechanism of sulfatide deficiency in Alzheimer's disease: an electrospray ionization mass spectrometric study. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 2003;49:809-18.
42. Gottfries CG, Karlsson I, Svennerholm L. Membrane components separate early-onset Alzheimer's disease from senile dementia of the Alzheimer type. *Int Psychogeriatr* 1996;8: 365-72.
43. Han X, Gross RW. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res* 2003;44:1071-9.
44. Han X, Fagan AM, Cheng H, Morris JC, Xiong C, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid sulfatide is decreased in subjects with incipient dementia. *Ann Neurol* 2003;54:115-9.
45. Pettegrew JW, Panchalingam K, Hamilton RL, McClure RJ. Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2001;26:771-82.
46. Soderberg M, Edlund C, Alafuzoff I, Kristensson K, Dallner G. Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *J Neurochem* 1992;59:1646-53.
47. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K et al. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2070-5.
48. Han X. Lipid alterations in the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer's disease: implication of the role of lipids in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2005;2:65-77.
49. He X, Huang Y, Li B, Gong CX, Schuchman EH. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2008;electronic.
50. Satoi H, Tomimoto H, Ohtani R, Kitano T, Kondo T, Watanabe M et al. Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: a role during neuronal apoptosis. *Neuroscience* 2005;130:657-66.
51. Walter A, Korth U, Hilgert M, Hartmann J, Weichel O, Hilgert M et al. Glycerophosphocholine is elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Neurobiol Aging* 2004;25:1299-303.