



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Možnosti biochemického vyšetření u Alzheimerovy choroby**

**Possibilities of Biochemical Treatment of Alzheimer's Disease**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: as. MUDr. Lenka Fialová, CSc.

**Daniela Píchová**

---

**Kladno, květen 2019**

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Píchová** Jméno: **Daniela** Osobní číslo: **469725**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**  
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

## II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Možnosti biochemického vyšetření u Alzheimerovy choroby**

Název bakalářské práce anglicky:

**Possibilities of Biochemical Treatment of Alzheimer's Disease**

Pokyny pro vypracování:

Alzheimerova nemoc je závažné neurodegenerativní onemocnění, které je nejčastější příčinou demence. Podkladem poškození mozku u Alzheimerovy nemoci je vznik intracelulárně uložených neurofibrilárních smotků obsahujících hyperfosforylovaný tau protein a extracelulárních amyloidních plaků. V diagnostice Alzheimerovy nemoci se uplatňují různé vyšetřovací metody jako je testování kognitivních funkcí, vyšetření mozku zobrazovacími metodami a stanovení různých analytů v mozkomíšním moku a v krvi. Bohaté zkušenosti jsou s vyšetřováním tripletů biomarkerů v mozkomíšním moku – celkového tau proteinu, fosforylovaného tau proteinu a peptidu beta-amyloidu, které mají vztah k patologicky ukládaným peptidům a bílkovinám v mozku nemocných. Předmětem bakalářské práce bude podat v teoretické části přehlednou informaci o biochemických ukazatelích stanovovaných v biologických tekutinách u pacientů s Alzheimerovou nemocí a v praktické části provést vyhodnocení vybraných biomarkerů u nemocných a kontrolní skupiny.

Seznam doporučené literatury:

[1] RUSINA, Robert a Radoslav MATĚJ, Neurodegenerativní onemocnění, Praha: Mladá fronta, Aeskulap, ISBN 978-80-204-3300-8

[2] ZVĚŘOVÁ, Martina, Alzheimerova demence, Praha: Grada Publishing, 2017, ISBN 978-80-271-0561-8

[3] Bartoš A., Čechová L., Švarcová J., Říčný J., Řípková D., Likvorový triplet (tau proteiny a beta-amyloid) v diagnostice Alzheimerovy-Fischerovy nemoci, Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, číslo 75(5): 587-594, 2012

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

**as. MUDr. Lenka Fialová, CSc.**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **28.09.2018**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2020**



prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.  
podpis vedoucí(ho) katedry



prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.  
podpis děkana(ky)

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Možnosti biochemického vyšetření u Alzheimerovy choroby vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Praze dne 16.05.2019

.....  
podpis

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat především vedoucí mé bakalářské práce as. MUDr. Lence Fialové, CSc. za trpělivost, ochotu, cenné rady a čas obětovaný řešení dané problematiky.

## **Abstrakt**

Alzheimerova nemoc (AN) je onemocnění postihující centrální nervovou soustavu a projevující se demencí. V mozku dochází u AN k extracelulárnímu ukládání beta amyloidu ( $A\beta$ ) za vzniku senilních plaků a intracelulárně vytvářejí hyperfosforylované formy tau proteinu (p-tau) neurofibrilární klubka (tangles). Následkem těchto změn dochází ke ztrátě funkcí neuronů a atrofii mozku.

Při stanovení diagnózy AN se kromě neuropsychologického vyšetření a zobrazovacích metod významně uplatňují i biochemické markery. V mozkomíšním moku se stanovuje tzv. likvorový triplet, tvořený celkovým tau proteinem (t-tau), p-tau proteinem a  $A\beta$ . Charakteristické změny těchto proteinů, které spočívají ve zvyšování hladin t-tau a p-tau proteinů a snižování hladiny  $A\beta$ , úzce souvisejí s tvorbou klubek a plaků v mozku u AN.

V praktické části byly vyhodnocovány koncentrace zmíněných proteinů, které byly měřeny pomocí komerčních souprav pro ELISU. Triplet proteinů byl stanoven v mozkomíšním moku 40 pacientů, kteří byli rozděleni na skupinu pacientů s AN (n=20) a kontrolní skupinu (n=20). AN byla diagnostikována podle kritérií NIA-AA (National Institute on Aging-Alzheimer's Association). Ve výsledcích byly t-tau a p-tau proteiny u pacientů s AN signifikantně zvýšené oproti kontrolní skupině.  $A\beta$  byl u pacientů s AN oproti kontrolní skupině signifikantně snížen. Korelace mezi veškerými proteiny kontrolní skupiny a mezi t-tau proteinem vs. p-tau proteinem u skupiny s AN vyšly pozitivní. Korelace u AN mezi t-tau proteinem vs.  $A\beta$  a p-tau proteinem vs.  $A\beta$  vyšly jako nesignifikantní.

## **Klíčová slova**

Alzheimerova nemoc; beta amyloid; biochemické vyšetření; demence; diagnostika; likvorový triplet; tau protein.

## **Abstract**

Alzheimer's disease (AD) affects the central nervous system and manifests by dementia. Inside the brain during AD, occurs extracellular deposition of beta amyloid ( $A\beta$ ), this forms senile plaques and intracellularly creates hyperphosphorylated forms of tau protein (p-tau) which produce neurofibrillar tangles. This leads to neuron's function loss and brain atrophy.

Biochemical markers are being used along with neuropsychological examination and imaging methods. In cerebrospinal fluid (CSF), the so-called CSF triplet is determined, formed by tau protein (t-tau), p-tau protein and  $A\beta$ . Characteristic changes in these proteins, which consist in increasing levels of t-tau and p-tau proteins and decreasing  $A\beta$  levels, are associated with forming tangles and plaques inside the brain during AD.

The practical part evaluates concentrations of the mentioned proteins, measured by ELISA kits. The protein triplet was determined in the CSF of 40 patients who were divided into a group of patients with AD (n = 20) and a control group (n = 20). AD was diagnosed according to the NIA-AA criteria (National Institute on Aging-Alzheimer's Association). Results show t-tau and p-tau proteins were significantly increased in AD patients compared to the control group.  $A\beta$  was significantly reduced in AD in comparison to the control group. Correlation between all proteins of the control group and t-tau protein vs p-tau protein in the AD group showed as positive. Correlation in AD between t-tau protein vs  $A\beta$  as well as p-tau protein vs  $A\beta$  resulted as nonsignificant.

## **Keywords**

Alzheimer's disease; beta amyloid; biochemical examination; dementia; diagnostics; cerebrospinal triplet; tau protein.

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav .....	10
2.1	Demence .....	10
2.1.1	Rozdělení demencí .....	11
2.2	Alzheimerova choroba .....	13
2.2.1	Historie .....	13
2.2.2	Epidemiologie .....	14
2.2.3	Etiologie a patogeneze.....	18
2.2.4	Klinický obraz .....	25
2.2.5	Diagnostika .....	27
2.2.6	Biochemické stanovení .....	30
2.2.7	Terapie .....	36
3	Cíl práce.....	39
4	Metodika.....	40
4.1	Charakteristika souboru.....	40
4.2	Odběr likvoru.....	41
4.3	Metody stanovení .....	42
4.3.1	INNOTEST PHOSPHO-TAU(181P)- princip stanovení .....	42
4.3.2	INNOTEST hTAU Ag – princip stanovení .....	43
4.3.3	INNOTEST $\beta$ -AMYLOID <sub>(1-42)</sub> – princip stanovení.....	44
4.4	Chemikálie a pomůcky.....	45
4.5	Postup .....	48
4.6	Statistické metody.....	50

5	Výsledky .....	51
5.1	Shrnutí výsledků.....	59
6	Diskuze .....	60
7	Závěr .....	63
8	Seznam použitých zkratk .....	64
9	Seznam použité literatury .....	66
10	Seznam použitých obrázků .....	72
11	Seznam použitých tabulek.....	74



# 1 ÚVOD

Alzheimerova nemoc (AN) či Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění, které vede k nevratnému poškození mozku. Postihuje především osoby po 65. roce věku. V České republice má AN diagnostikováno 20–30 % osob<sup>[4]</sup>. A čísla se stále zvyšují. Proto představuje AN epidemiologický problém, který zatím nemá jednoznačné řešení.

AN patří zatím mezi nevléčitelné nemoci, a proto je pro zpomalení jejího nástupu důležitá včasná diagnostika. V důsledku toho, že se většina symptomů podobá běžnému procesu stárnutí, se tato nemoc diagnostikuje velmi těžko<sup>[4]</sup>. Nejprve se provádí neuropsychologické vyšetření pomocí kognitivních testů, následně se používají zobrazovací metody pro určení míry postižení mozku nebo pro odlišení jiného neurologického onemocnění od AN<sup>[6,10]</sup>.

Součástí diagnostického procesu je i vyšetření mozkomíšního moku a séra pacienta. Mezi nejdůležitější markery AN patří tau protein (t-tau) a beta amyloid ( $A\beta$ ). U těchto markerů dochází v případě tau proteinu k hyperfosforylaci a následně ke zvýšení koncentrace celkového i fosforylovaného tau proteinu (p-tau) jak v likvoru, tak v séru. U  $A\beta$  dochází ke snížení koncentrace v důsledku tvorby amyloidových plak v extracelulární části mozku. Zvyšují se i markery oxidačního stresu nebo lehké řetězce neurofilament<sup>[16]</sup>.

Časná diagnostika AN umožňuje zpomalení rozvoje nemoci a nasazení adekvátní farmakologické i nefarmakologické terapie.

## 2 SOUČASNÝ STAV

### 2.1 Demence

*„Demence je syndrom způsobený chorobou mozku, obvykle chronické nebo progresivní povahy, kde dochází k porušení mnoha vyšších nervových kortikálních funkcí, k nimž patří paměť, myšlení, orientace, chápání, počítání, schopnost učení, jazyk a úsudek. Vědomí není zastřeno“<sup>[1, str. 191]</sup>.*

Demence se objevuje především u lidí starších 65 let a jejich počet se zvyšuje hlavně díky tomu, že klesá počet lidí umírajících předčasně. Tato choroba ovlivňuje nejen jednotlivce, kteří pozvolna přicházejí o rozumové schopnosti, ale také jejich příbuzné, kteří se o nemocného starají – pozorují jeho změny nálad a zároveň zvyšující se potřeby v péči<sup>[2]</sup>.

Avšak navzdory zdánlivě jednoduchým předpokladům je určení klinické diagnózy velmi složité. Důvodem jsou například od začátku se zhoršující a často i nejasné fyzické slabosti nebo psychiatrické symptomy jako je například deprese. Cílenou terapii také navíc komplikuje vývoj jednotlivých symptomů, který může trvat v řádu několika desítek let. Mnoho vědců se neustále snaží o identifikaci biomarkerů v dřívější fázi onemocnění, ale vzhledem ke spojování kognitivního úpadku s normálním stárnutím je komplikované diagnostikovat demenci v raném stádiu. Pro zdravotnictví a sociální péči 21. století je tedy demence největší světovou výzvou<sup>[2,3]</sup>.

Životní styl jednotlivce může toto riziko rozvoje onemocnění snížit, nebo naopak zvýšit. Jako prevence nebo k oddálení demence může přispět kontinuální vzdělávání, fyzické cvičení, udržování sociálních aktivit, omezování nebo úplné vynechání kouření, snaha o zvládnutí depresí, obezity, udržování glykémie a krevního tlaku ve fyziologickém rozmezí<sup>[2]</sup>.

Ne každý může takto měnit svůj životní styl. Některé změny ale rozdíl stejně nezaručí a někdy je demence dokonce dědičná. Nicméně, oddálení demence o pár let by jen u malého procenta lidí by byl obrovský úspěch a umožnil by mnoho dalším lidem dosáhnout sklonku života bez rozvinutí demence<sup>[2]</sup>.

### 2.1.1 Rozdělení demencí

Demence se dělí podle dvou kritérií – podle etiologie a lokalizace.

#### 1. Dělení dle etiologie

Podle etiologie se demence klasifikují na dvě skupiny a to na skupinu primárně neurodegenerativních demencí a na demence sekundární.

U primárních neurodegenerativních demencí dochází k atrofii mozku, proto jsou také často označovány jako demence atroficko-degenerativní. Působí tam však více patogenetických změn a to hlavně degenerace a tvorba a ukládání patologických proteinů. Podle toho, o jaký protein se jedná, se tyto demence dále dělí (tabulka 1)<sup>[4]</sup>.

Dále do primární skupiny patří demence vznikající na základě působení:<sup>[4]</sup>

- poruchy tvorby a vazby nervových růstových faktorů
- poruchy mitochondriálního metabolismu
- nadměrné tvorby volných kyslíkových radikálů
- projevů sterilního zánětu
- poruchy centrální neurotransmise<sup>[4]</sup>

Sekundární demence vznikají na základě předcházejícího onemocnění. Nejčastěji se jedná o ischemicko-vaskulární demence, kde je hlavní příčinou vzniku mozkový infarkt. Dále mohou být podmíněny metabolickými poruchami (Wilsonova nemoc), priony, infekcí (lymská borelióza, AIDS), posttraumaticky, dalšími patologickými procesy postihujícími mozek jako jsou tumory, hypovitaminózy, paraneoplastické

procesy a v neposlední řadě mohou být způsobeny také intoxikací (alkohol, farmaka, otrava CO, drogy – reverzibilní)<sup>[4]</sup>.

Tabulka 1 – rozdělení primárních demencí<sup>[4, str. 28-29]</sup>

<b>Demence primární (atroficko-degenerativní)</b>	
DEMENCE PODLE PATOLOGICKÉHO PROTEINU	PŘÍKLAD ONEMOCNĚNÍ
beta amyloidová demence	Alzheimerova choroba, demence s Lewyho tělísky
tau proteinové demence	frontotemporální demence, Alzheimerova choroba, demence s Lewyho tělísky
alfa-synukleinové demence	demence u Parkinsonovy choroby, demence typu Parkinson+, demence s Lewyho tělísky
Huntingtonova demence (huntingtin)	Huntingtonova choroba

## 2. Dělení dle lokalizace v mozku

Na základě lokalizace se demence dělí na kortikální, subkortikální a kortikosubkortikální (tabulka 2)<sup>[4]</sup>.

Tabulka 2 – rozdělení demencí podle lokalizace<sup>[4, str. 31-32]</sup>

LOKALIZACE	POSTIŽENÁ ČÁST	PŘÍZNAKY	CHOROBY
kortikální demence	mozková kůra	poruchy zapamatování si nových informací, afázie, agnózie, apraxie, poruchy orientace	Alzheimerova choroba, kortikální formy demencí s Lewyho tělísky, frontotemporální

		v prostoru a čase	lobární demence aj.
subkortikální demence	bílá hmota, thalamus, bazální ganglia	dysexekutivní syndrom (porucha motivace, schopnost rozhodování se, plánování), zpomalené psycho-motorické tempo, deprese	demence u Parkinsonovy choroby, vaskulární Binswangerova choroba, demence u Huntingtonovy choroby
kortiko-subkortikální demence	různou měrou postižena kortikální a subkortikální složka	kombinace příznaků u kortikální a subkortikální demence	Alzheimerova choroba s vaskulární složkou, kortiko-subkortikální vaskulární demence aj.

## 2.2 Alzheimerova choroba

Jedná se o progresivní neurodegenerativní onemocnění, u kterého dochází extracelulárně k ukládání  $A\beta$  za vzniku senilních plaků a intracelulárně p-tau proteinu vytvářející neurofibrilární klubka (tangles). Následně ubývají neurony, což má za následek atrofii mozkové tkáně<sup>[5]</sup>.

### 2.2.1 Historie

Výzkum AN zahájili roku 1892 Blocq a Marinesco objevem senilních plaků v mozkové tkáni. Původ samotného názvu pro toto onemocnění je přisuzován psychiatrovi a neurologovi Aloisi Alzheimerovi. Ten nejdříve na své přednášce

v roce 1906 a později uveřejněním jeho práce roku 1907 popsal případ zemřelé 55leté pacientky Auguste Deterové, která zemřela na diagnózu těžké demence<sup>[6]</sup>.

Alzheimer při vyšetřování zemřelé A. Deterové našel v jejím mozku velké množství zvláštních plaků a vláken. Také zjistil, že senilní plaky prostupují do horní vrstvy v takové míře, že jsou viditelné i na nebarvených preparátech. Následně Alzheimer provedl stovky pitev mozkových tkání a objevil neuronální klubka. V roce 1910 Alzheimerův spolupracovník profesor Kraepelin ve své knize poprvé uvedl pojem Alzheimerova nemoc<sup>[4, 6]</sup>.

Ve stejnou dobu, v roce 1907 v Praze publikoval své poznatky psychiatr a neuropatolog Oskar Fischer. Zabýval se výzkumem senilních plaků, které našel v kůře dvanácti mozků lidí, u kterých byla diagnostikována senilní demence, dále v deseti případech u starších pacientů, u nichž byla stanovena diagnóza funkční psychózy a u deseti osob, které byly označeny za zdravé. Fischer tedy jako první autor dokázal výskyt senilních plaků u starších, klinicky zdravých jedinců<sup>[6]</sup>.

Jeho objev byl ale zapomenut, jelikož v době před druhou světovou válkou byl Fischer, jakožto Žid, postupně pracovně degradován, poté zatčen gestapem a uvězněn v Malé pevnosti v Terezíně. Roli hrála i velká konkurence mezi neuropatology v Praze a Mnichově<sup>[4]</sup>.

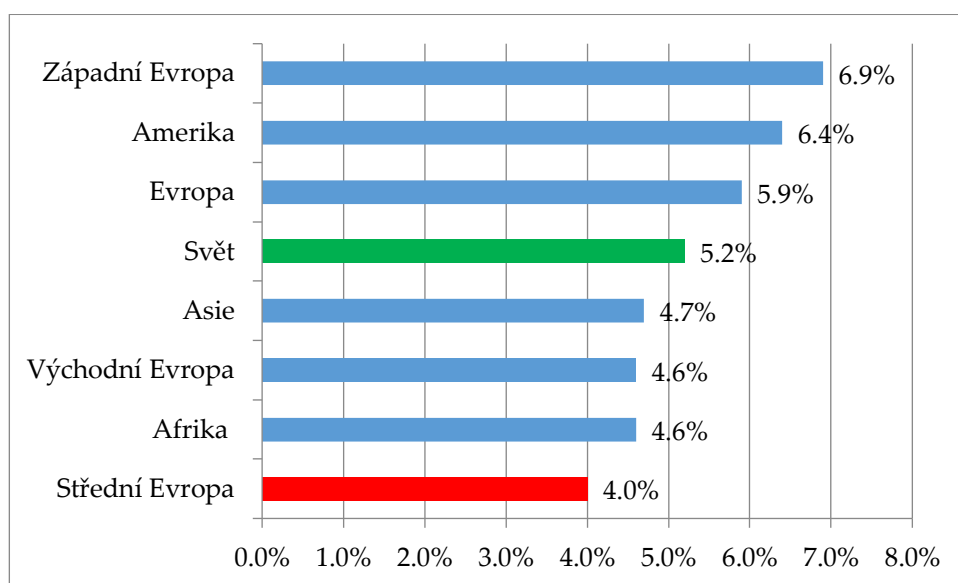
Zapomenuté studie Oskara Fischera objevil až roku 2009 M. Goedert v archivu Univerzity Karlovy v Praze<sup>[4]</sup>.

### **2.2.2 Epidemiologie**

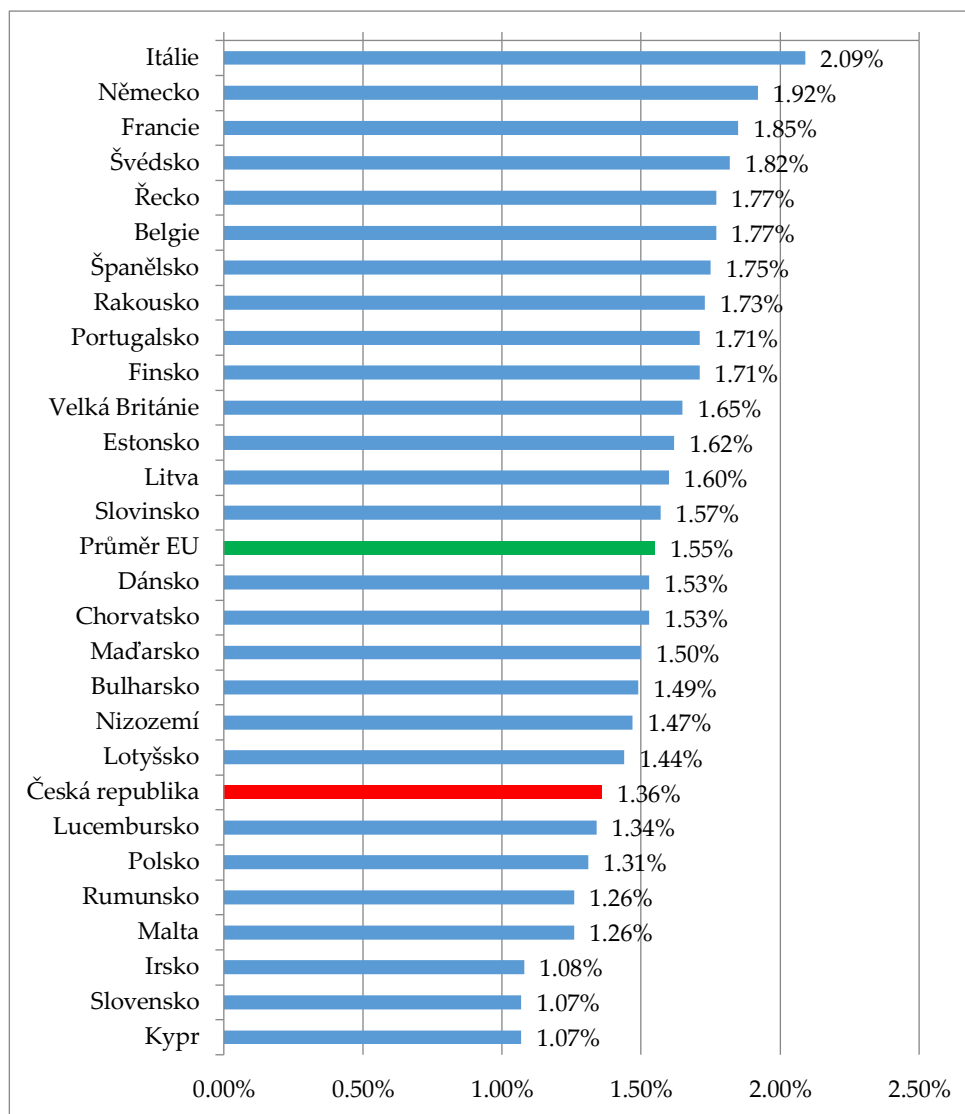
Prevalence AN roste s věkem a to zejména po 65. roce věku. Ženy jsou více ohroženy než muži a demence u nich způsobuje cca 15 % z celkových úmrtí. Ve věku od 80 let postihuje toto onemocnění více než 10 % populace<sup>[4, 5]</sup>.

Podle předpokladu bude v roce 2050 2,5x vyšší počet obyvatel v České republice postiženo demencí. Péče o nemocné klade nároky na soukromé i veřejné rozpočty, zároveň je předpokládáno globální stárnutí a to bude mít za následek změnu poměru mezi nemocnými s demencí a zdravými lidmi. Dnes připadají na 100 zdravých, práceschopných lidí 3 nemocní, v roce 2050 by jich mohlo být 5–6<sup>[4]</sup>.

Přesné odhady prevalence demence jsou důležité v rámci strategického plánování zdravotnické a sociální politiky na regionální, národní i mezinárodní úrovni. Umožňují odhadnout náklady, které bude potřeba využít pro zdravotní péči, podporu a léčbu nemocných. Z tohoto důvodu se provádějí statistické výpočty, které informují o aktuálním procentuálním zastoupení nemocných v populaci<sup>[7]</sup>. Příklady tohoto statistického zpracování jsou znázorněny na obrázku 1 a 2.



Obrázek 1 - Mezinárodní srovnání výskytu demence u osob starších 60 let k roku 2015<sup>[8]</sup>

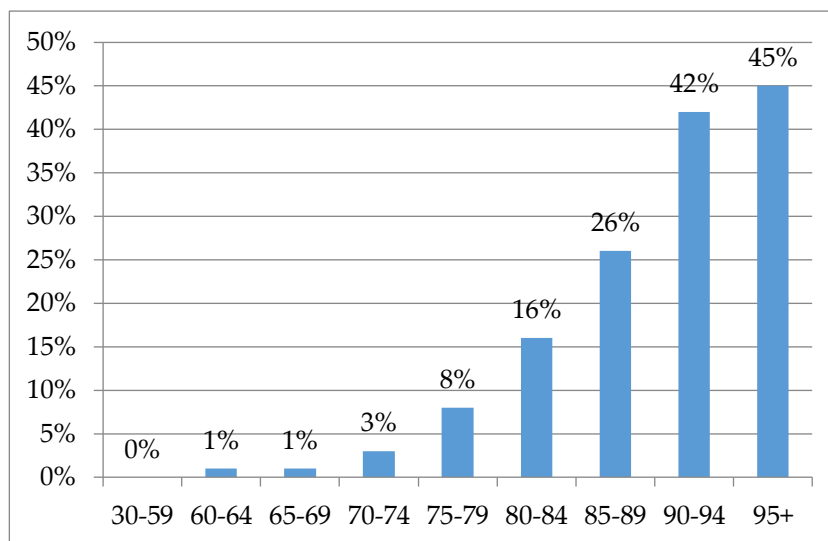


Obrázek 2 – Výskyt demence v Evropské unii k roku 2013<sup>[4, str. 20, 7]</sup>

### Rizikové faktory pro vznik AN

Jedny z hlavních neovlivnitelných faktorů jsou věk a pohlaví. AN souvisí s rostoucím věkem (obrázek 3) a vyskytuje se častěji u žen<sup>[4]</sup>. Není ale zcela jasné, zda je zvyšující se výskyt nemoci vázán konkrétně na věk nebo na proces stárnutí. Není dostatek údajů o tom, zda po 90. roce četnost AN stoupá, nebo už dál neroste<sup>[6]</sup>.





Obrázek 3 – Výskyt AN podle věkových skupin v EU k roku 2013<sup>[4, str. 21]</sup>

Mezi další rizikové faktory patří rodinná anamnéza, kdy se při výskytu nemoci v rodině zvyšuje riziko výskytu AN v další generaci<sup>[6]</sup>. Z genetického hlediska se jedná o přítomnost apolipoproteinu E4 (ApoE4), který se nachází na 12. chromosomu<sup>[4, 6]</sup>.

Částečně ovlivnitelným faktorem je metabolický syndrom u lidí ve středním nebo pozdním věku. Tento syndrom zahrnuje obezitu, hypertenzi, hyperglykémii, zvýšenou hladinu triacylglycerolů a snížený HDL cholesterol. Hyperglykémie je projevem diabetu mellitu (DM). V rámci rizikových faktorů pro vznik AN se jedná o DM 2. U pacientů trpících hypertenzí se vyskytuje větší množství neurofibrilárních klubek a plaků a jsou pozorovány vaskulární patologické změny na mozku, jako jsou mozková krvácení nebo mikroinfarkty. Také může docházet k špatnému prokrvení mozku v důsledku změny v cévní stěně při hypertenzi. Tyto faktory mohou vést ke vzniku AN<sup>[4, 9]</sup>.

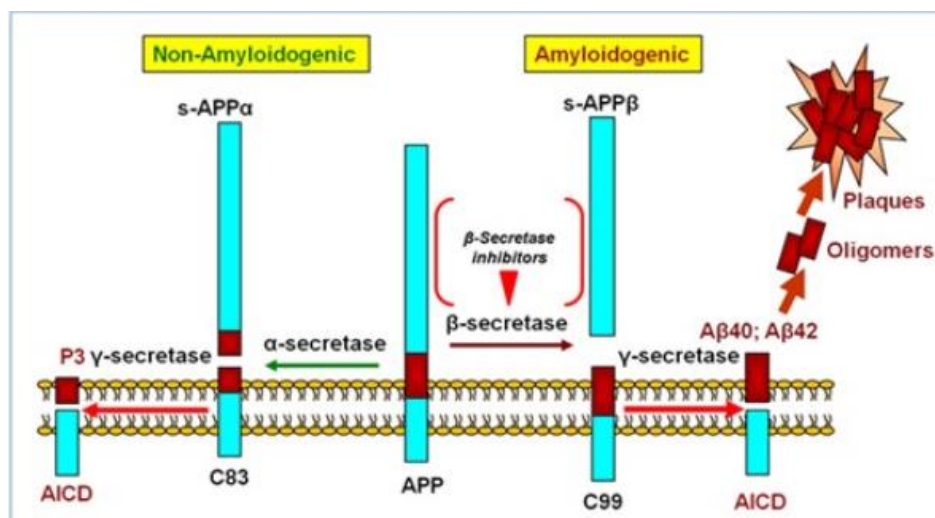
Při hypercholesterolémii dochází ke zvýšené produkci A $\beta$ , protože jednou z jeho funkcí je kontrola transportu cholesterolu<sup>[9]</sup>.

Dále se uvažuje o vlivu kouření, požívání alkoholu a úrazech hlavy se ztrátou vědomí<sup>[4, 6]</sup>.

### 2.2.3 Etiologie a patogeneze

Příčiny a mechanismy, které vedou ke vzniku onemocnění AN, nejsou stále zcela jasné. Mezi hlavní patogenetické mechanismy patří tvorba intracelulárně uložených neurofibrilárních klubek, které jsou složeny z p-tau proteinu, a extracelulárně uložených senilních plaků, jejichž základní složkou je  $A\beta$ <sup>[4, 12]</sup>.

$A\beta$  vzniká štěpením amyloid prekurzorového proteinu (APP), který je uložen v membráně nervových buněk, podporuje jejich růst a reparaci. U zdravých jedinců je APP štěpen převážně  $\alpha$ -sekretázou na fragmenty o délce 1–40 aminokyselin (AMK) a jen malá část je štěpena  $\gamma$ -sekretázou, která odštěpuje fragmenty o délce 40–42 AMK. Je to tzv. neamyloidogenní cesta, u které nedochází ke vzniku  $A\beta$ . Vznikající části jsou rozpustné a plní svou fyziologickou funkci (podílejí se na tvorbě synapsí a mají svou úlohu v plasticitě mozku) a nepůsobí v mozkové tkáni patologické změny. Pokud ale dojde k štěpení APP  $\beta$ - a následně  $\gamma$ -sekretázami, jedná se o amyloidogenní cestu, při které vznikají méně toxické fragmenty  $A\beta_{40}$  a větší neurotoxické  $A\beta_{42}$ , které se začnou shlukovat a vytváří polymery ukládající se do mezibuněčných prostor v kůře mozkové a tvořící  $\beta$ -amyloidové senilní plaky. Tento proces znázorňuje obrázek 4<sup>[23, 31]</sup>.



Obrázek 4 – V levé části fyziologické štěpení APP  $\alpha$ - a  $\gamma$ -sekretázou (neamyloidogenní cesta), v pravé části patologické štěpení APP  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázou vedoucí ke vzniku senilních plaků (amyloidogenní cesta)<sup>[34, str. 17]</sup>

Přeměna jednoduchých monomerů  $A\beta$  na složitější oligomery je spojena se změnou sekundární struktury z  $\alpha$ -helixu na  $\beta$ -skládaný list. V důsledku této strukturální změny jsou oligomery nerozpustné a nedají se štěpit. U  $A\beta_{42}$  jsou AMK na N- a C-terminálním konci ve formě  $\beta$ -skládaného listu, který stabilizuje molekulu a dochází tak k tvorbě fibril a následně k agregaci (obrázek 5 vlevo). U  $A\beta_{40}$  nedochází k takovéto změně struktury, je rozpustnější a i proto, že je to menší molekula, se snadněji dostává přes hematoencefalickou bariéru<sup>[23, 31]</sup>.

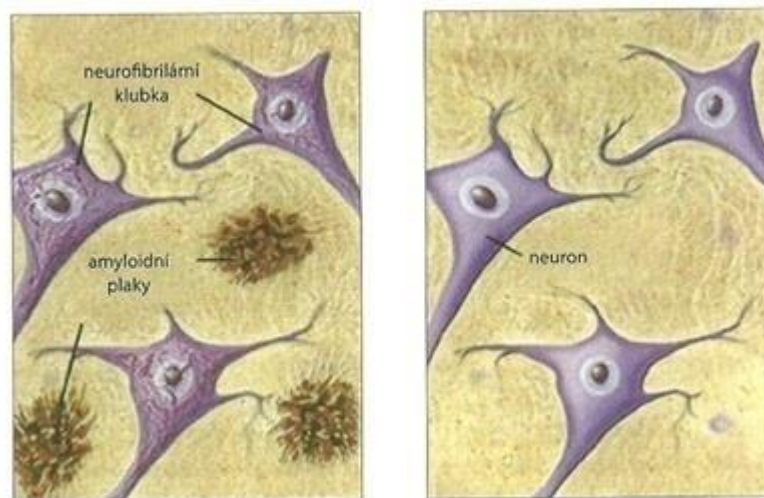
Senilní plaky jsou neurotoxické a vyvolávají zánětlivou reakci organismu, při které dochází k produkci reaktantů akutní fáze např. interleukinů. Dále se k poškozené nervové tkáni mohou přemisťovat zvětšené mikroglie, které mají fagocytární funkci<sup>[23, 24, 31]</sup>. Narušuje se membrána nervové buňky a zároveň dochází k interakci oligomerů  $A\beta$  s proteiny a enzymy mitochondrií, konkrétně s enzymem amyloid beta vázajícím alkohol dehydrogenázou  $A\beta$  (ABAD). Výsledkem je mitochondriální dysfunkce uvnitř neuronu a oxidační stres, v rámci něhož je poškozována tkáň kyslíkovými radikály<sup>[30, 31]</sup>.

Existuje teorie, ve které by mohly být reaktivní formy kyslíku vznikající procesem oxidační fosforylace v mitochondriích a reaktivní sloučeniny dusíku při tvorbě amyloidových plaků podnětem pro spuštění imunitní reakce a tak i pro tvorbu reaktivních sloučenin. Tento proces může vést k nekróze nebo dokonce apoptóze mozkových buněk<sup>[29]</sup>. Ve vytvořených senilních placích je vyšší koncentrace kovových iontů než ve zdravé tkáni. Jedná se o ionty železa, mědi a zinku. Železo má samo o sobě oxidační potenciál a přispívá ke vzniku kyslíkových radikálů. Zároveň se železo i měď váží na histidinové a tyrozinové zbytky amyloidu. Vedlejším produktem této reakce je peroxid vodíku, který působí neurotoxicky a dále může podněcovat tvorbu kyslíkových radikálů. Zinek naopak soutěží s mědí o navázání se na amyloid a tak předchází tvorbě peroxidu vodíku. Následkem navázání velkého množství zinku je urychlení tvorby senilních plaků<sup>[29]</sup>.

Toxické polymery A $\beta$  také způsobují uvolňování excitačních AMK (glutamát, aspartát), které se vážou na ionotropní receptory a tím dochází k průchodu vápníku do nervové buňky. Vápník spouští signální kaskády vedoucí až k apoptóze buňky. Tomuto jevu se říká excitotoxicita<sup>[4]</sup>. Dále iniciují tvorbu kináz, které se podílejí na fosforylaci tau proteinu. Konkrétně se jedná o enzym glykogen syntáza kináza 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) za účasti enzymu cyklin dependentní kinázy 5 (CDK 5)<sup>[4, 23, 24]</sup>.

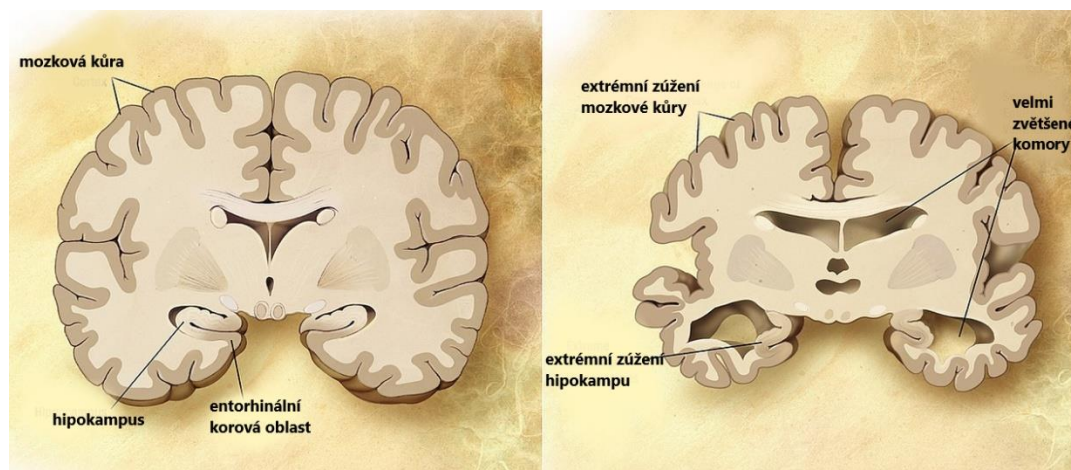
T-tau protein se u zdravého člověka váže na aktinová filamenta neuronu a slouží jako stabilizátor mikrotubulární sítě, která zajišťuje správnou funkci axonů a přenos nervového vzruchu<sup>[15, 25]</sup>. Také dochází k interakci s organelami nacházejícími se v cytoplasmě například s mitochondriemi. Normální t-tau protein obsahuje 2–3 moly fosfátu na 1 mol proteinu<sup>[4]</sup>. Fosforylace t-tau určuje jeho afinitu k mikrotubulům, proto když dojde k jeho hyperfosforylaci, odštěpí se z mikrotubulů a vlákna poškozeného t-tau proteinu se rozpletou. Následně se začnou spojovat do párově heliakálních filament, které jsou základem pro tvorbu

neurofibrilárních klubek (obrázek 5 vlevo)<sup>[23, 25]</sup>. Mikrotubuly v cytoskeletu nemohou dál plnit svou funkci axonálního transportu<sup>[5]</sup>.



Obrázek 5 – Na obrázku vpravo jsou zdravé neurony, obrázek vlevo znázorňuje senilní plaky a neurofibrilární klubka u AN<sup>[26]</sup>

V důsledku tvorby těchto patologií je navozena programovaná buněčná smrt neuronů – apoptóza a to vede ke vzniku atrofie mozku, která je znázorněna na obrázku 6.

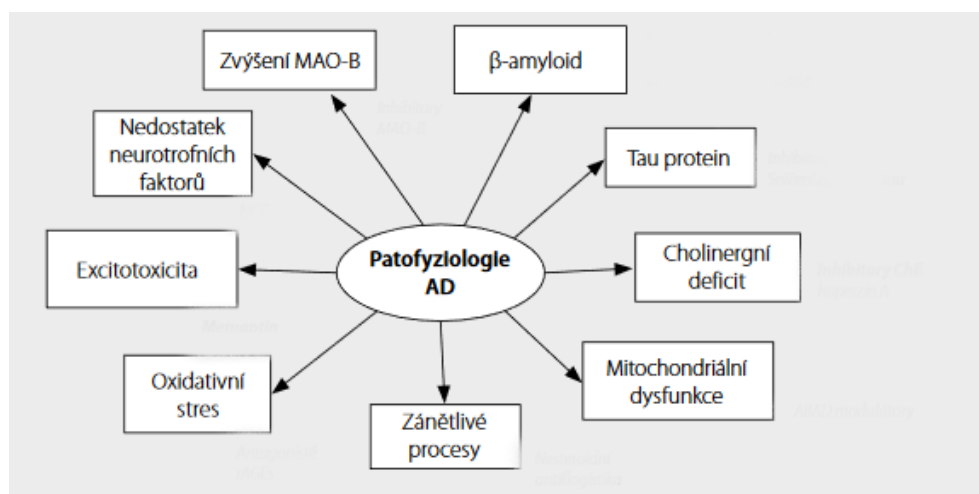


Obrázek 6 – Vlevo mozek zdravého jedince vyššího věku, vpravo znázornění mozku, u kterého dochází k atrofii<sup>[27]</sup>

Při AN dochází v důsledku nefunkčnosti jednotlivých struktur k ovlivňování funkcí neurotransmiterových systémů a zároveň osy hypotalamus-hypofýza-kůra nadledvin (HPA). Jako první je postižen acetylcholinergní neurotransmiterový systém. Snižuje se tvorba enzymu cholinacetyltransferázy, který vytváří acetylcholin z cholinu a koenzymu A, k nedostatečnému vychytávání cholinu ze synaptické štěrby a ke zvýšené produkci butyrylcholinesterázy, která acetylcholin odbourává. Tento patologický proces vede k poruše krátkodobé paměti a ztrátě pozornosti<sup>[23]</sup>.

Aktivita HPA se zvyšuje a tím dochází k nadměrné sekreci glukokortikoidů hlavně kortizolu. Dalším markerem, který se při poruše neuronů zvýší, je homocystein. Je závislý na přítomnosti vitamínu B (B9 – folát, B12 – kobalamin, B6 – pyridoxin, B2 – riboflavin). Při nedostatku folátů je pravděpodobné, že se naruší metabolismus monoaminových neurotransmiterů, které ovlivňují řadu mozkových funkcí. Jsou degradovány a zpětně vychytávány monoaminoxidázami (MAO)<sup>[4]</sup>. MAO existují ve dvou izoformách MAO-A a MAO-B lišící se zastoupením v buňkách a tkáních, substrátem a svými specifickými inhibitory. Pokud se zvýší hladina MAO-B, dojde k nadměrné syntéze kyslíkových radikálů<sup>[30]</sup>. Dále u reakcí katalyzovaných MAO dochází ke vzniku neurotoxických vedlejších produktů (amoniak, peroxid vodíku)<sup>[4]</sup>.

Veškeré patologické procesy vedoucí ke vzniku AN zobrazuje obrázek 7.



Obrázek 7 – Shrnutí neuropatologických nálezů při AN<sup>[30, str. 8]</sup>

V praxi se z pohledu etiopatogeneze AN dělí na dvě skupiny podle dědičnosti a podle vzniku onemocnění<sup>[4]</sup>.

Na základě dědičnosti rozlišujeme familiární a sporadickou formu AN. U sporadické formy nejsou zjištěny genetické predispozice a není přítomen výskyt onemocnění v rodině, je tedy podmíněna multifaktoriálně. Sporadickou formu ovlivňují rizikové faktory, mezi které patří hlavně věk a přítomnost alely ApoE. Naopak familiární neboli dědičná forma se v rodině vyskytuje alespoň ve dvou generacích po sobě. Familiární forma se dále může dělit podle toho, na jakém chromosomu došlo k mutaci do skupin AD1–AD15<sup>[4, 5, 24]</sup>.

Z hlediska počátku vzniku nemoci se AN dělí na časnou (early-onset) a pozdní formu (late-onset)<sup>[4]</sup>.

Nejrozšířenější je sporadická forma onemocnění s pozdním počátkem, která se vyskytuje u 75 % pacientů. Naopak familiární AN (FAD) s časným začátkem je diagnostikována cca u 5 % pacientů. Ke vzniku FAD přispívají autozomální dominantní mutace v těchto genech:<sup>[4, 9]</sup>

- a) APP: přítomen na chromosomu 21. Pokud dojde k mutaci, zvýší se štěpení  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázami a tím se vytvoří větší množství delších fragmentů  $A\beta$ . Ty se nejprve spojují a tvoří oligomery, které jsou neurotoxické. Následně vznikají polymery, které se ukládají do mezibuněčných prostor v mozkové kůře a tvoří senilní plaky, typické pro AN<sup>[23]</sup>. Vyskytuje se nejčastěji u pacientů kolem 40–50. roku a 10–15 % těchto mutací představuje časnou formu AN. U dětí s Downovým syndromem (trizomie 21) je 5x vyšší riziko vzniku AN<sup>[4, 9]</sup>.
- b) Presenilin 1 (PSEN 1): přítomen na chromosomu 14. Počátek AN mezi 44–46. rokem života. Jedná se o nejčastější formu mutace pro vznik časně formy FAD. PSEN 1 kóduje bílkovinnou složku v  $\gamma$ -sekretáze a přítomnost mutace v tomto genu je charakterizována modifikací  $\gamma$ -sekretázy, která není schopna dostatečně štěpit  $A\beta$ . Dochází k tvorbě dlouhých řetězců, které jsou neurotoxické a vytvářejí plaky<sup>[4, 9]</sup>.
- c) Presenilin 2 (PSEN 2): přítomen na chromosomu 1, k rozvoji nemoci dochází mezi 45–85. rokem života. PSEN 2 tvoří společně s PSEN 1 a dalšími složkami  $\gamma$ -sekretázu. Při mutaci dochází ke zvýšené tvorbě  $A\beta_{40}$  a  $A\beta_{42}$  a zároveň u osob, které mají tuto mutaci, byla zjištěna souvislost s hypercholesterolémií. V mozkové tkáni se zvyšuje obsah cholesterolu LDL a triacylglycerolů a naopak snižuje obsah cholesterolu HDL. Tato mutace je nejméně častá, vyskytuje se cca v 5 % případů<sup>[4, 9]</sup>.
- d) T-tau: přítomen na chromosomu 17. Mutace v MAP (Microtubule-Associated Proteins) genu, který kóduje t-tau protein vedou ke vzniku hyperfosforylované formy tohoto proteinu a následně k tvorbě neurofibrilárních klubek<sup>[4, 25]</sup>.



Alela ApoE4 se může vyskytovat u časné i u pozdní formy. U pozdní sporadické a familiární formy AN je významnějším faktorem<sup>[4, 9]</sup>. ApoE4 za normálních okolností vykonává v těle fyziologické funkce jako je například transport cholesterolu v krvi. Vyskytuje se ve třech izoformách, přičemž izoforma E4 zvyšuje riziko vzniku AN nejvíce. Pokud je člověk homozygotem pro alelu ApoE4, je u něj 83% pravděpodobnost vzniku AN během života. Pokud ale není nositelem této alely, je pravděpodobnost 9%<sup>[4]</sup>. Pro rané formy AN jsou rizikové genové mutace na chromozomech 21, 14 a 1<sup>[6]</sup>. S genovou mutací na chromosomu 21 souvisí také Downův syndrom, charakterizovaný trizomií zmíněného chromosomu. Na tomto chromosomu se nachází gen pro tvorbu APP, to znamená, že při mutaci dochází k tvorbě zvýšeného množství A $\beta$  a plaků. U 40–75 % pacientů s Downovým syndromem dojde k rozvinutí AN<sup>[4, 5]</sup>.

Senilní plaky sami o sobě nezpůsobují kognitivní úpadek pacienta, ale ovlivňují procesy jako je tvorba p-tau proteinu, zánětlivou reakci a nefunkčnost mitochondrií. Z toho vyplývá, že ke vzniku sporadické AN vede velké množství na sebe navazujících mechanismů<sup>[31]</sup>.

#### **2.2.4 Klinický obraz**

Protože se AN může u každého jednotlivého člověka projevovat jinak, je její diagnostika složitá. Je obtížné rozlišit AN a normální proces stárnutí jedince a to i z důvodu, že není známo, jak dlouho trvá období před projevem prvních příznaků<sup>[6, 10]</sup>. U AN se rozlišují tři stádia nemoci a to:

1. Preklinické stádium – pacient je bez příznaků, ale lze prokázat biomarkery, které ukazují na AN (ukládání A $\beta$  a t-tau nebo p-tau v mozku)<sup>[5]</sup>.
2. Prodromální stádium – pacient je zcela soběstačný, ale dochází k prvním známkám kognitivního úpadku (mírná kognitivní porucha). Provádí se neuropsychologická vyšetření, vyšetření zobrazovacími metodami a potvrzení pozitivního nálezu biomarkerů<sup>[5]</sup>.

3. Plně rozvinuté stádium – u pacienta je rozvinuta demence, není schopen vykonávat denní činnosti. Diagnostika na základě anamnézy, psychologických vyšetření popřípadě zobrazovacích metod a biomarkerů<sup>[5]</sup>.

AN se řadí mezi neurodegenerativní onemocnění, doprovázené snížením až úplnou ztrátou funkce mozkových buněk. Prvotní příznaky se odvíjejí dle toho, na kterém místě mozku dojde k degeneraci<sup>[10]</sup>. Ve většině případů je rozložení neuropatologických změn nesouměrné. Pokud se poškodí dominantní hemisféra, dochází k afázii. Naopak větší změny v pravé hemisféře se projevují agnózií a poruchou orientace<sup>[5]</sup>.

Uvádí se, že prvním příznakem je ztráta krátkodobé paměti a z hlediska dlouhodobé paměti porucha explicitní epizodické paměti (co, kde a kdy)<sup>[5]</sup>. Nemocný jedinec si například nepamatuje, jaké jídlo měl k snídani, nebo kdo přišel na návštěvu. V důsledku poruchy krátkodobé paměti může docházet u nemocného i k opakování jednotlivých činností nebo vět<sup>[5, 6, 10]</sup>.

Mezi další symptomy patří ztráta orientace na dosud pro pacienta známých místech (vlastní byt, město, ve kterém pacient žije). Ztráta orientace netrvá dlouho, většinou v řádu minut. Dochází k afázii a agnózií. V rámci afázie se jedná o poruchy slovní paměti, která způsobuje neporozumění slovům a používání jiných pojmenování pro běžně známé věci. Agnózie se projevuje neschopností rozpoznat předměty nebo lidi. V některých případech může nemocnému pomoci jiný smysl, např. pokud nepoznává nemocný člověka na pohled, může ho poznat po hlase. U nemocného jedince nejsou v časném stádiu pozorovatelné fyzické symptomy. Dochází pouze k apraxii, to znamená, že jedinec zapomene nějakou činnost, kterou dříve vykonával automaticky (řízení)<sup>[6, 10]</sup>.

Přítomnost deprese se nepovažuje jako symptom AN, ale jako její následek. Nemocný jedinec nemůže vykonávat činnosti, které dříve dělal běžně a mnohdy si

uvědomuje, že přináší určité břemeno pro příbuzné, kteří se o něj starají. Takovéto pocity mohou vést k depresi a k apatii<sup>[10]</sup>.

V průběhu onemocnění dochází k poruše exekutivních funkcí. Nemocný jedinec není schopen plánovat, ovládat své emoce (agrese) a fungovat ve společnosti<sup>[5, 10]</sup>. U většiny případů je přítomna anozognozie, kdy si pacient neuvědomuje svou nemoc<sup>[5]</sup>. Méně často se objevují halucinace a paranoia. V konečném stádiu onemocnění jsou pacienti zcela apatičtí, nekomunikují a jsou inkontinentní<sup>[6]</sup>.

Doba přežití od prvotních symptomů se pohybuje mezi 7–10 lety, přičemž pacient je 5–8 let závislý na okolí<sup>[5]</sup>. Ženy s touto chorobou žijí déle než muži<sup>[6]</sup>. Průměrná doba přežití u nemocných s ranou formou bývá kratší než u pozdní formy. Dále je u rané formy horší průběh afázie a agnózie<sup>[6]</sup>.

Rozlišení rané a pozdní formy závisí na změnách v mozku před vznikem onemocnění. Během přirozeného stárnutí se zmenšují neurony a zanikají synapse v částech mozku různým způsobem. Na základě rozdílného vzhledu neuronů u rané a pozdní formy AN, by se dalo rozpoznat, o jakou z těchto dvou forem se jedná<sup>[6]</sup>.

### **2.2.5 Diagnostika**

Jak už bylo zmíněno výše, je diagnostika AN z důvodu podobajících se příznaků přirozenému stárnutí poměrně složitá. Pokud je podezření na AN, provádí se nejprve psychologické testování, které hodnotí kognitivní funkce pacienta a to konkrétně řeč, paměť, prostorovou orientaci, pozornost, schopnost řešit problémy a běžné fungování v denních činnostech<sup>[4]</sup>. Testy, které se využívají pro zjištění kognitivních schopností jedince, jsou například:

- Montrealský kognitivní test, který je poměrně složitý a hodnotí zvláště mírnou formu kognitivních poruch u časných demencí<sup>[11]</sup>.

- Test MMSE (Mini-Mental State Examination) patří mezi nejpoužívanější<sup>[4]</sup>. Hodnotí celkové kognitivní funkce a určuje stupeň postižení podle bodů, které pacient při vyšetření získá. Hodnotí se 6 kritérií a to časoprostorová orientace (konkrétní rok, země, roční období), paměť, řeč (pojmenovávání konkrétních věcí), počítání a pozornost, čtení a psaní, zrakově-prostorové schopnosti<sup>[11]</sup>.

Tento test je poměrně jednoduchý, takže ho zvládnou i jedinci, u kterých teprve dochází k rozvoji AN. Není tedy vhodný pro záchyt onemocnění<sup>[11]</sup>.

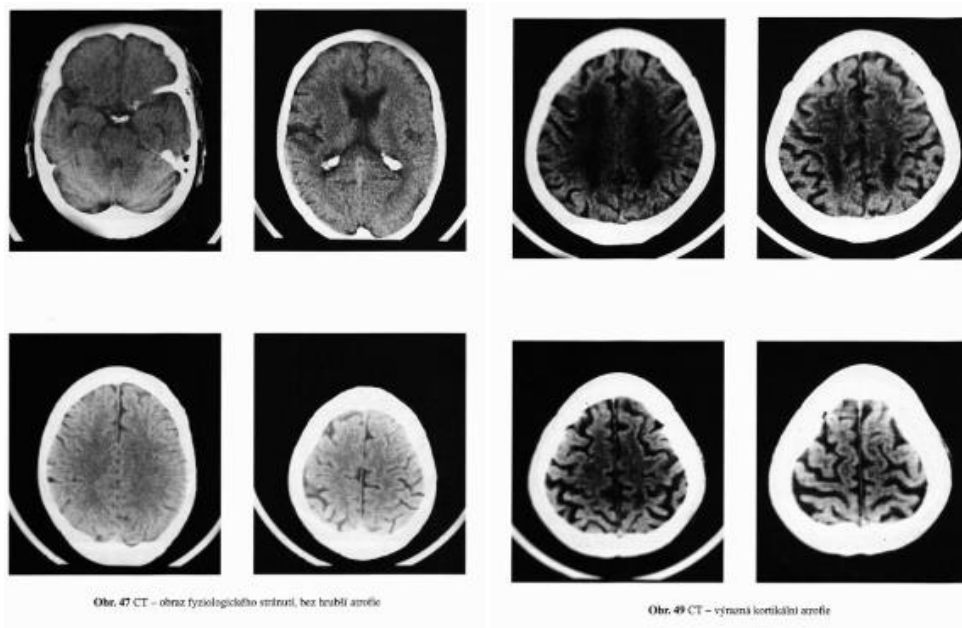
- Addenobrookský kognitivní test česká verze (ACE-R-CZ), která je specifitější než test MMSE<sup>[12]</sup>. Slouží k rozdělení demencí a zároveň je vhodný k časnemu zjištění kognitivních poruch<sup>[11]</sup>.

Kritéria pro diagnostiku AN jsou dána institutem NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders – Alzheimer's Disease and Related Dementias Association). Vypracována byla roku 1984 McKhannem a kolektivem a v roce 2011 aktualizována. Mezi hlavní kritéria pro diagnostiku AN patří přítomnost časného a významného narušení paměti, které musí splňovat následující specifika:<sup>[4, 13]</sup>

- a) Postupná porucha paměti trvající minimálně 6 měsíců.
- b) Důkaz poruchy signifikantní epizodické paměti v testech.
- c) Porucha epizodické paměti může probíhat samostatně nebo může být součástí jiné kognitivní změny na začátku nebo v průběhu AN<sup>[4, 13]</sup>.

Dále se hodnotí nálezy, které podporují diagnózu AN. Využívají se pomocné metody, které potvrzují nebo naopak vylučují diagnózu určenou podle těchto kritérií. Jako metody vyšetření, které určují strukturální podklad demencí, jsou užívány magnetická rezonance (MR), případně výpočetní tomografie (CT), pokud je pacient kontraindikován pro vyšetření MR. Tyto zobrazovací metody umožňují

zjistit mediální atrofické změny, ke kterým dochází na základě snížení objemu hippocampů, entorhinálního kortexu a amygdaly (obrázek 8)<sup>[4, 5, 13, 15]</sup>.



Obrázek 8 – Zobrazovací metoda CT – vlevo obraz fyziologického stárnutí, vpravo obraz kortikální atrofie<sup>[9, str. 20]</sup>

Toto vyšetření pomůže lékařům odhalit příčiny vzniku demence a rozlišit zda se jedná o sekundární demenci, u které by byl přítomen např. nitrolební expanzivní proces, hydrocefalus, traumata, mozkový infarkt atd.<sup>[14]</sup>.

Mezi funkční zobrazovací metody patří pozitronová emisní tomografie (PET) a jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT)<sup>[14]</sup>. PET se využívá k průkazu poruchy metabolismu glukózy parietálně a temporálně (FDG-PET) nebo zobrazuje depozita A $\beta$ , na která se v mozkové tkáni váže tzv. Pittsburská substance B. Pomocí SPECT se prokazuje parietálně a temporálně snížené prokrvení tkáně<sup>[5]</sup>. Využívají se tedy k zobrazení oblastí sníženého mozkového metabolismu<sup>[14]</sup>. V ČR se PET skoro vůbec nepoužívá, zato SPECT patří k hlavním funkčním zobrazením mozku<sup>[15]</sup>.

Diagnózu AN také potvrzuje přítomnost autozomálně dominantních mutací familiárně a stanovení biochemických ukazatelů v mozkomíšním moku nebo periferní krvi (viz podkapitola biochemická stanovení)<sup>[4, 13]</sup>.

Na základě hodnocení těchto kritérií a změřených hodnot se diagnóza dělí na jistou, pravděpodobnou, možnou a nepravděpodobnou<sup>[4, 13]</sup>.

Dělení AN podle kritérií NINCDS-ADRDA:<sup>[4]</sup>

1. Jistá AN – pacient splňuje daná kritéria a navíc je u něj přítomen histopatologický průkaz biopsií nebo při pitvě<sup>[4]</sup>.
2. Možná AN – u pacienta je diagnostikována demence, ale nemá typický průběh nebo klinický obraz jako AN (rychlý začátek, kolísavý průběh), u této AN není známá etiologie<sup>[4]</sup>.
3. Pravděpodobná AN – u pacienta je potvrzena demence psychiatrickým testováním (MMSE, ACE-R-CZ,...) přičemž dochází k postupnému zhoršování paměti. Tato forma se vyskytuje u jedinců ve věku 40–90 let a nesmí být zároveň přítomno jiné systémové onemocnění nebo porucha mozku, která by vedla ke vzniku demence<sup>[4]</sup>.
4. Nepravděpodobná AN – u pacienta náhle dojde ke vzniku demence společně s poruchami pohybu a deficitem zorného pole. Někdy mohou být přítomny epileptické záchvaty<sup>[4]</sup>.

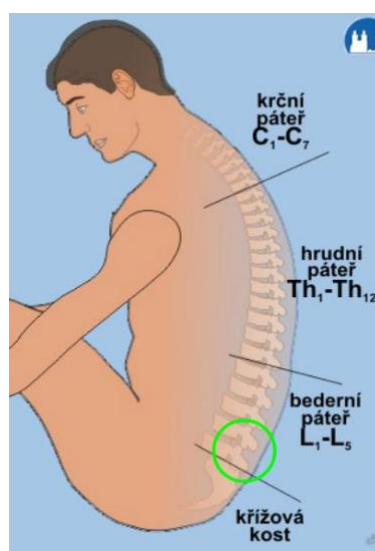
### **2.2.6 Biochemické stanovení**

Biochemická stanovení přispívající k diagnóze AN se provádějí hlavně v mozkomíšním moku, dále v séru/plazmě, buňkách a experimentálně v moči.

#### **Stanovení biomarkerů v likvoru**

Mozkomíšní mok se pro vyšetření odebírá lumbální punkcí pomocí jehly s mandrénem. Pro pacienta je lepší používat tzv. atraumatické jehly, které snižují

riziko vzniku postpunkčního syndromu (bolest hlavy, zvracení, porucha zraku), ale zároveň nejsou hrazeny Všeobecnou zdravotní pojišťovnou. Odebírá se 10–15 ml likvoru, což je množství, které nepřivodí výraznou změnu mozkomíšního tlaku<sup>[14, 17]</sup>. Lumbální punkce se provádí od trnů bederních obratlů L2/L5 po L5/S1 (obrázek 9) vleže na boku nebo vsedě v hloubce 4–8 cm<sup>[14]</sup>. Odebraný vzorek likvoru se při transportu chladí a měl by být co nejrychleji dopraven do laboratoře<sup>[28]</sup>.

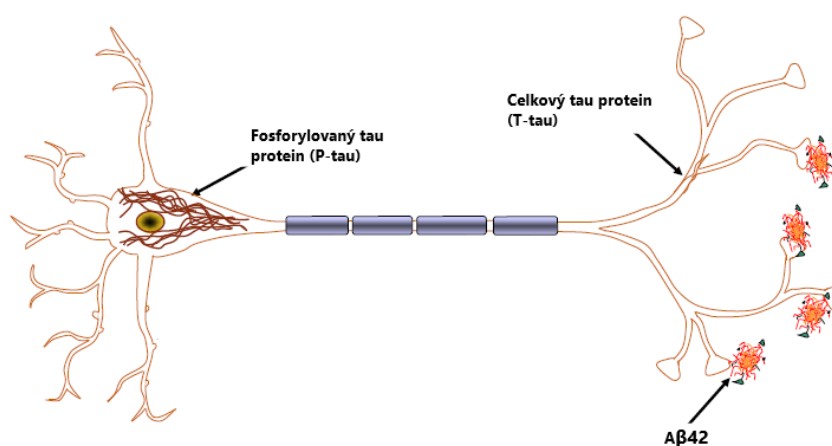


Obrázek 9 – Zobrazení místa vpichu pro lumbální punkci<sup>[17, str. 3]</sup>

Mimo stanovení speciálních markerů, které se tvoří v rámci patogeneze AN, se v mnohých laboratořích provádí také základní vyšetření likvoru. Konkrétně se počítá albuminový kvocient určující prostupnost hemato-likvorové bariéry, cytologie a stanovuje se glukóza a laktát v likvoru a zároveň v krvi pro porovnání za účelem zjištění energetického metabolismu<sup>[14, 28]</sup>.

V důsledku histopatologických změn, ke kterým patří tvorba amyloidových senilních plaků a neurofibrilárních klubek, dochází k biochemickým změnám v mozkové tkáni. Ty se odrážejí v likvoru, neboť je v přímém kontaktu s extracelulární částí mozku. V likvoru se stanovuje tzv. likvorový triplet (obrázek

10), který zahrnuje t-tau, p-tau a peptid A $\beta$  vyskytující se ve dvou formách, které obsahují 40 nebo 42 aminokyselin v závislosti na C-terminálním konci<sup>[12, 15, 16, 19]</sup>. Oba tau proteiny, p-tau protein i t-tau protein jsou fosforylovány, rozdíl je v tom, že p-tau je hyperfosforylovaný. P-tau obsahuje fosforylace vždy na konkrétních místech. Nejčastěji na AMK serinu nebo treoninu. Konkrétní izoformy s fosforylací na daném místě pomáhají odlišit AN od ostatních demencí<sup>[15, 32]</sup>.



Obrázek 10 – Schéma neuronu s intracelulárními neurofibrilárními klubky a extracelulárními senilními plaky. Na obrázku jsou zároveň zobrazeny základní biomarkery AN stanovující se v mozkomíšním moku<sup>[18, str. 654]</sup>

Nejen u pacientů s diagnostikovanou demencí dochází ke snížení hladiny A $\beta$ 42 a ke zvýšení hladiny p-tau a t-tau proteinu, ale je tomu tak i u mírného kognitivního deficitu. Změny likvorového tripletu tedy poukazují i na budoucí rozvoj AN<sup>[32]</sup>. T-tau protein udává míru poškození a degenerace mozkové tkáně. Zvyšuje se u různých onemocnění centrální nervové soustavy a neurodegenerací, proto to není specifický marker pro AN. Z tohoto důvodu se měří hladina p-tau proteinu, což je vlastně t-tau protein, u kterého u AN došlo k patogenetické změně a to k hyperfosforylaci<sup>[16]</sup>. Hodnoty, které po vyšetření poukazují na AN, jsou uvedeny v tabulce 3.



Tabulka 3 – Hraniční koncentrace, senzitivita a specifita u hlavních markerů stanovených v likvoru zjištěné dlouholetým výzkumem doc. Bartoše<sup>[15]</sup>

Marker v likvoru	Hraniční koncentrace [pg/ml]	Senzitivita	Specifita
A $\beta$	>448	38 %	92 %
t-tau protein	< 334	72 %	85 %
p-tau protein	< 57	62 %	95 %

Je potřeba stanovit koncentrace všech markerů, neboť jednotlivé proteiny sami o sobě nevypovídají o konkrétním onemocnění pacienta. Nejčastěji se porovnávají změřené hodnoty t-tau proteinu a A $\beta$  mezi sebou nebo také poměr mezi A $\beta$ 40 a A $\beta$ 42. Stanovení obou proteinů vede ke zvýšení správnosti diagnózy. Specifita i senzitivita tohoto stanovení se pohybuje kolem 85 %. P-tau určuje diagnózu AN zejména podle míst, kde došlo k fosforylaci, ale zároveň se porovnává s t-tau proteinem, kdy zvýšený podíl p-tau o 33 % ukazuje na AN<sup>[14, 15, 32]</sup>. Vyšetření proteinů tripletu v likvoru se provádí imunometodou ELISA v analyzátoch nebo ručně.

V důsledku vzniku oxidačního stresu se ve vysoké míře produkují kyslíkové radikály. Dochází k peroxidaci lipidů a to zejména k peroxidaci kyseliny arachidonové a dokosahexaenové kyseliny, která obsahuje 6 dvojných vazeb. Proto je dokosahexaenová kyselina náchylnější k napadení radikály. Tato reakce vede k tvorbě izoprostanů, což jsou izomery prostaglandinů. U AN byly zjištěny zvýšené koncentrace F2-izoprostanů vznikající z kyseliny arachidonové a F4-izoprostanů, které jsou produktem kyseliny dokosahexaenové. Peptidové vazby v proteinech se vlivem kyslíkových radikálů štěpí a vznikají karbonylové deriváty, nebo dochází

k reakci s AMK zbytky za vzniku nitrotyrosinu. Jeho hladina je poté v likvoru zvýšena a dá se měřit<sup>[20, 33]</sup>.

V likvoru se mohou dále stanovovat neurofilamenta, která jsou přítomna v neuronech centrálního i periferního systému. Jsou to markery poškození axonu, přičemž nejčastěji se stanovují lehké řetězce neurofilament (NFL). Díky své nízké molekulové hmotnosti mohou do likvoru při porušení axonální struktury neuronu snadněji pronikat<sup>[12]</sup>. Znamená to, že při poruše nervových buněk dochází ke zvýšení koncentrace NFL (někdy i středních neurofilament).

### **Stanovení biomarkerů v séru/plazmě**

Vyšetření biomarkerů v séru/plazmě je pro pacienty méně invazivní vyšetření, které se dá snadněji několikrát opakovat. Nevýhodou je, že se do krevního řečiště dostane jen zlomek proteinů pocházejících z mozkové tkáně, oproti likvoru, který je s mozkovou tkání přímo v kontaktu. Zároveň mohou být mozkové proteiny uvolněné do krve degradovány proteázami, metabolizovány v játrech nebo vyloučeny ledvinami. Tyto mechanismy mohou vést k odchýlkám u naměřených hodnot, které ale nesouvisí se změnami v mozkové tkáni. Také může dojít k ovlivnění výsledků analytických metod v důsledku interference mozkových proteinů a proteinů vyskytujících se ve vysoké míře v plazmě, jako je albumin nebo imunoglobulin G (IgG)<sup>[12, 18]</sup>.

Markery AN, které se mohou stanovovat v plazmě/séru:

- $A\beta$  v plazmě – Vyšetření peptidu  $A\beta$  v plazmě, není tak průkazné jako v likvoru. Výsledky měření u pacientů s AN a kontrolní skupinou jsou stejné nebo se liší velmi málo. Důvodem může být interferenční ovlivnění použité metody, kterou je obvykle ELISA nebo jiná standardní imunometoda. Bylo zjištěno, že se  $A\beta$  vyskytuje hlavně u familiárního typu AN a to v důsledku vzniku mutací APP, tedy i APP, které jsou

obsaženy v krevních destičkách. Toto stanovení není tedy vhodné pro včasnou diagnózu AN, ale při využití citlivějších a specifitějších metod jako je např. single-molecule array (Simoa) nebo imunoprecipitační hmotnostní spektrometrie by mohlo stanovení A $\beta$  sloužit pro předpověď rizika vzniku AN<sup>[18, 19]</sup>.

- T-tau protein v plazmě – Ultrasenzitivní imunometody umožňují měřit zvýšení plazmatických koncentrací t-tau u AN. Mezi hodnotami t-tau proteinu v likvoru a plazmě je vysoká korelace<sup>[18]</sup>.
- NFL – Měření hodnot se používá v preklinické fázi onemocnění. Krevní NFL detekuje neurodegeneraci, to znamená, že není specifická pro AN, ale může sloužit jako jednoduchý, neinvazivní screening, který je schopen primárně vyloučit neurodegeneraci<sup>[18]</sup>.

Proteinový triplet a NFL v séru nebo plazmě nepatří mezi běžná biochemická stanovení u neurodegenerace. Provádí se výzkumy, které hodnotí hladiny u zdravých jedinců a u pacientů s diagnózou AN.

Z krve se v rámci podezření na kognitivní úpadek pacienta dále provádí kompletní vyšetření zahrnující krevní obraz, sedimentaci, jaterní enzymy, hodnoty minerálů, glykémie, urea, kreatinin a homocystein (viz podkapitola o etiologii a patogenezi). Tato vyšetření mohou pomoci odhalit jiné příčiny vzniku demence než je AN<sup>[14]</sup>. Dále se vyšetřují zánětlivé markery, které mohou vznikat v důsledku tvorby amyloidových plaků vyvolávajících například reakci akutní fáze nebo aktivaci komplementu. Mezi tyto markery patří například cytokiny, CRP, TNF  $\alpha$  a IL-6<sup>[19, 20]</sup>.

### **Stanovení biomarkerů v cirkulujících buňkách a v moči**

V rámci buněk se stanovuje APP a sekretázy v krevních destičkách. Krevní destičky obsahují formy APP, které jsou shodné s mozkovými. Proteáza Nexin II,

kteřá inhibuje aktivitu faktorů srážení krve je shodná s rozpustným APP. Krevní destičky mají v některých směrech stejnou funkci jako nervové buňky (skladování a uvolňování neurotransmiterů). Při AN dochází ke snížení koncentrace APP o vyšší molekulové hmotnosti (130 kDa) ve srovnání s APP s nižší molekulovou hmotností (110 kDa). Toto vyšetření se využívá ke kontrole terapie nebo k upřesnění diagnózy<sup>[19]</sup>.

Na základě štěpení APP lze rozeznat v krevních destičkách dva typy sekretáz a to  $\alpha$  a  $\beta$ .  $\beta$ -sekretáza (BACE) je zodpovědná za štěpení APP, které vede ke vzniku  $A\beta$ .  $\alpha$ -sekretáza (ADAM10) nedává svým štěpením vzniknout amyloidu (neamyloidogenní cesta). U pacientů s AN dochází ke snížení tvorby a aktivity ADAM10 a ke zvýšení aktivity BACE<sup>[19]</sup>.

Některé studie uvádí možnost detekce jednoho biomarkeru v moči a to neuronálního nitkovitého proteinu (NTP). Detekce NTP využívá test založený na monoklonální protilátce. Výsledky měření naznačují, že NTP je vhodný jako biomarker u rozvinuté AN, ale není vhodný pro záchyt tohoto onemocnění<sup>[20]</sup>.

### 2.2.7 Terapie

Vzhledem k nedostatku informací o etiopatogenezi AN, patří toto onemocnění mezi nevléčitelné. Pokud je AN diagnostikována v raném stádiu je možnost průběh nemoci zpomalit, ale ne zastavit. Potlačují se a léčí pouze symptomy, které nemoc provázejí<sup>[4, 5]</sup>.

Existují farmakologické a nefarmakologické přístupy k léčbě AN<sup>[4]</sup>.

Farmakoterapie se ubírá dvěma směry, které jsou založené na důkazech:<sup>[21]</sup>

1. Inhibitory mozkových cholinesteráz (acetyl- a butyrylcholinesteráza) – inhibitory dokážou zablokovat enzymy, které odbourávají acetylcholin. Tím dojde ke zlepšení acetylcholinergního přenosu, to znamená ke

zvýšení počtu molekul, které budou schopny se navázat na své muskarinové a nikotinové receptory. Acetylcholinergní systém je důležitý pro paměť a úroveň vědomí<sup>[21, 22]</sup>. Mezi užívající se léky patří:

- a) Donepezil – Inhibitor acetylcholinesteráz<sup>[21]</sup>.
- b) Galantamin – Inhibuje acetylcholinesterázy a *in vitro* dokázal zajistit alosterickou změnu nikotinových receptorů<sup>[21, 30]</sup>.
- c) Rivastigmin – Inhibitor acetylcholinesteráz i butyrylcholinesteráz v mozku, má více nežádoucích účinků např. na gastrointestinální trakt. Velmi dobře působí na psychotické příznaky AN<sup>[21]</sup>.

2. Inhibitory NMDA (N-methyl-D-aspartátových) receptorů glutamatergního systému – u AN dochází k uvolňování velkého množství aminokyselin (glutamát, aspartát), které vyvolávají podráždění následně vedoucí k hyperexcitaci vlastních receptorů, mezi nimi i NMDA. NMDA receptory slouží k otevření iontového kanálu pro Na<sup>+</sup> a Ca<sup>2+</sup> ionty. Dochází také ke zvýšenému vstupu Ca<sup>2+</sup> iontů do neuronů v důsledku nedostatečného vychytávání glutamátu v hippocampu, dochází ke změně metabolismu některých proteinů a nakonec k apoptóze neuronů. S tím souvisí i porušení dlouhodobé potenciace. Používá se přípravek memantin, který snižuje excitotoxické působení na neurony<sup>[21]</sup>.

Mezi testované léky patří inhibitory MAO-B, které jsou zároveň vhodné pro snížení tvorby acetylcholinesteráz. Látky, které inhibují  $\beta$ - a  $\gamma$ - a zároveň aktivují  $\alpha$ -sekretázy, redukují tvorbu A $\beta$ . Lithium a valproát se testují jako látky tlumící tvorbu GSK-3 $\beta$ , což by vedlo ke snížení fosforylaci tau proteinu, mezi další látku fungující na stejné bázi patří LMTM (derivát metylenové modři). Snaha je také o navození aktivní imunizace pro A $\beta$  vakcinací, u pacientů ale dochází k nežádoucím účinkům (např. meningoencefalitidy u 6 % testovaných). Lepších výsledků dosahuje pasivní imunizace proti A $\beta$ . Nevýhodou je, že se protilátky musejí dostat přes hematoencefalickou bariéru a podávají se opakovaně proti konkrétním antigenům. Experimentuje se s intravenózními imunoglobuliny, jejichž

směs obsahuje polyklonální protilátky od dárce krve a malou část protilátek přímo proti A $\beta$  a s plazmaferézou<sup>[30]</sup>.

Aktivní imunizace u t-tau je zaměřena na jeho patologické formy, proti kterým je vyvolána imunitní odpověď. Nejvýznamnější testovanou vakcínou je AADvac1, u které zatím nebyly prokázány neurotoxické vedlejší účinky<sup>[30]</sup>.

Nefarmakologická léčba souvisí se správným psychologickým přístupem k nemocným. Snaží se o oddálení momentu, kdy pacient nebude schopen fungovat ve společnosti a zároveň nebude zvládat běžné denní činnosti. Zahrnuje různé typy rehabilitací, cvičení kognitivních a nekognitivních funkcí pomocí různých testů atd. Do této léčby musejí být zapojeni i příbuzní pacienta, neboť při umístění nemocného do zdravotnického zařízení může dojít ke zhoršení pacientova stavu v důsledku neznalosti tohoto prostředí a tím způsobeného stresu<sup>[4]</sup>.

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je v teoretické části charakterizovat AN a uvést postup při diagnóze tohoto onemocnění. Podrobněji se zaměřuje na biochemické stanovení v biologických tekutinách u AN, konkrétně na tzv. proteiny likvorového tripletu. Mezi ně patří celkový tau protein, hyperfosforylovaný tau protein a peptid beta amyloid. Tyto markery vznikají na základě senilních plaků a neurofibrilárních klubek, které se vytvářejí extracelulárně a intracelulárně v mozku.

V praktické části budou biochemické markery likvorového tripletu stanovené metodou ELISA v mozkomíšním moku statisticky vyhodnoceny u souboru 40 pacientů. Naměřená data budou porovnávána mezi pacienty s diagnostikovanou AN a kontrolní skupinou. Pomocí korelačních koeficientů bude určen vztah mezi jednotlivými proteiny.

## 4 METODIKA

### 4.1 Charakteristika souboru

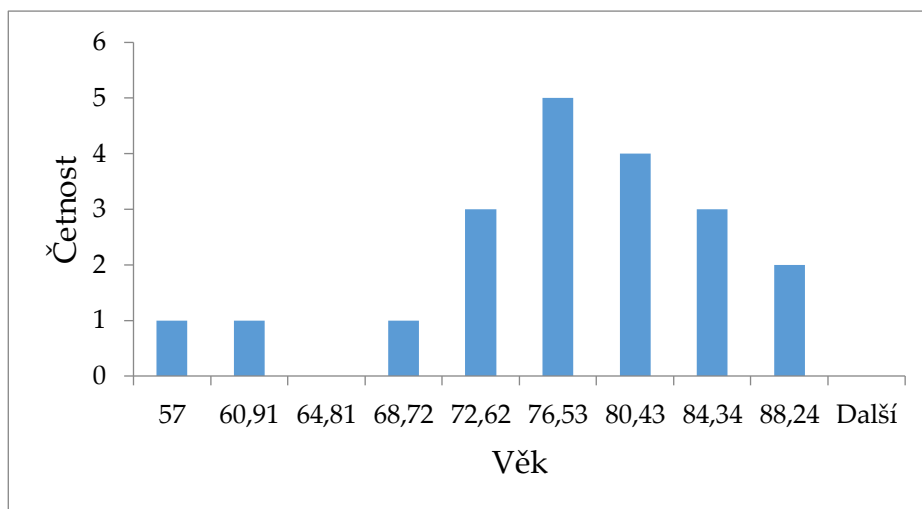
Náš soubor tvořilo 40 pacientů, kteří byli rozdělení na skupinu pacientů s AN (n=20) a kontrolní skupinu (n=20). Výběr pacientů pro testování byl založen na určení správné diagnózy. Alzheimerova nemoc byla diagnostikována zkušenými neurology na základě kritérií NIA-AA (National Institute on Aging-Alzheimer's Association)<sup>[39]</sup>.

Kognitivní funkce pacientů byly hodnoceny pomocí aktualizované ACE-R-CZ. Test ACE-R-CZ je 20–30 minutové podrobnější vyšetření kognitivních funkcí než MMSE. U všech pacientů s demencí a u většiny kontrol bylo provedeno vyšetření mozku pomocí MR nebo CT (v případě kontraindikací pro MR). Byla vyloučena intrakraniální patologie a vyhodnocena velikost hippocampu<sup>[38]</sup>.

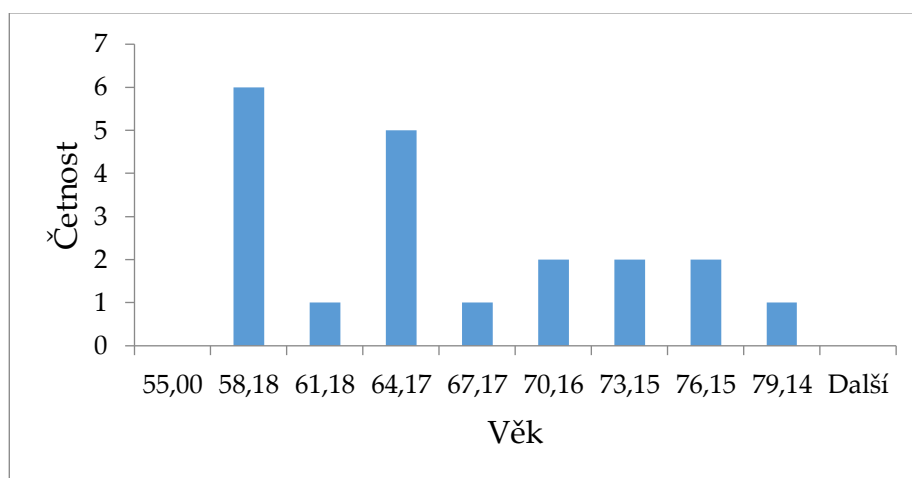
Osoby zařazené do kontrolní skupiny měli normální skóre MMSE a ACE-R-CZ. Lumbální punkce u nich byla provedena za účelem diferenciální diagnostiky onemocnění, které nezahrnovalo kognitivní poruchu (např. polyneuropatie, vyloučení neuroinfekce, subarachnoidálního krvácení).

Věkové rozmezí vyšetřovaných pacientů bylo od 55–88 let. Protože bylo zastoupení u AN normálně rozdělené a u kontrolní skupiny nenormálně, byla použita popisná statistika pro obě rozdělení [průměr  $\pm$  směrodatná odchylka; medián (mezikvartilové rozpětí)]. Konkrétní zastoupení věkových kategorií je znázorněno na histogramu na obrázku 11 pro pacienty s diagnostikovanou AN [75  $\pm$  8 let; 75 (72–80) let] a na obrázku 12 pro kontrolní skupinu [65  $\pm$  7 let; 64 (58–70) let].





Obrázek 11 – Histogram zobrazující věkové rozložení u pacientů s diagnostikovanou AN



Obrázek 12 – Histogram zobrazující věkové rozložení u kontrolní skupiny

## 4.2 Odběr likvoru

Pro analýzu se jako biologický materiál používal mozkomíšní mok. Ten byl odebírán nejlépe ráno lumbální punkcí, která byla provedena na úrovni L3/L4 nebo L4/L5. Nejdříve se nechalo pár kapek odtéci a poté byl likvor sbírán do polypropylenové zkumavky. Ve vzorku nesměla být příměs krve<sup>[35]</sup>.

Lumbální mozkomíšní mok byl po odebrání centrifugován, alikvotován v 1ml polypropylenových zkumavkách a skladován v průměru 1,5 hodiny od vzorkování při -80 °C podle stanovených směrnic až do analýzy. Vzorky byly rozmrazeny těsně před analýzami. Teplota trvala cca 30 minut při pokojové teplotě. Před měřením byly vzorky a další reagenty promíchány na vortexu.

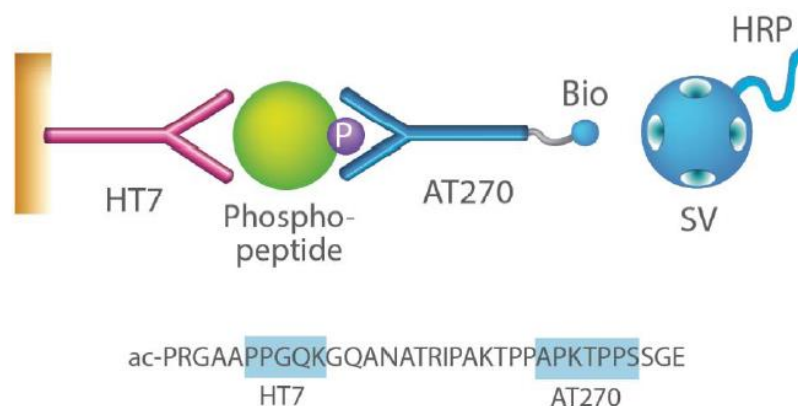
### **4.3 Metody stanovení**

Měření tripletů proteinů v likvoru se provádělo metodou ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), založenou na principu sendvičové enzymové analýzy. Byly použity komerční soupravy od firmy Fujirebio (N. V., Gent, Belgium). Konkrétně pro stanovení p-tau, t-tau a A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Použití těchto tří testů umožňuje diferenciaci mezi AN a normálním stárnutím nebo jinými neurologickými onemocněními.

#### **4.3.1 INNOTEST PHOSPHO-TAU(181P)- princip stanovení**

Jedná se o enzymovou imunoanalýzu na pevné fázi. V jamkách mikrotitračních destiček je navázána specifická monoklonální protilátka HT7 (IgG1) proti p-tau proteinu nebo jeho fragmentům. Do těchto jamek se přidají vzorky odebraného likvoru společně s konjugátem 1, kterým je monoklonální biotinylovaná protilátka AT270 proti tau proteinu fosforylovaném na pozici 181. Následuje inkubace, při které dochází k imunochemické reakci mezi proteinem a monoklonálními protilátkami. Po inkubaci se jamky promyjí, aby došlo k odstranění nenasazených složek. Do jamek se přidá konjugát 2, kterým je streptavidin značený křenuvou peroxidázou pro detekci komplexů antigen-protilátka. Po přidání pracovního substrátového roztoku dojde k zabarvení vzorků. Reakce se zastaví stop roztokem a do 15 minut od zastavení se měří absorbance při vlnové délce 450 nm. Intenzita

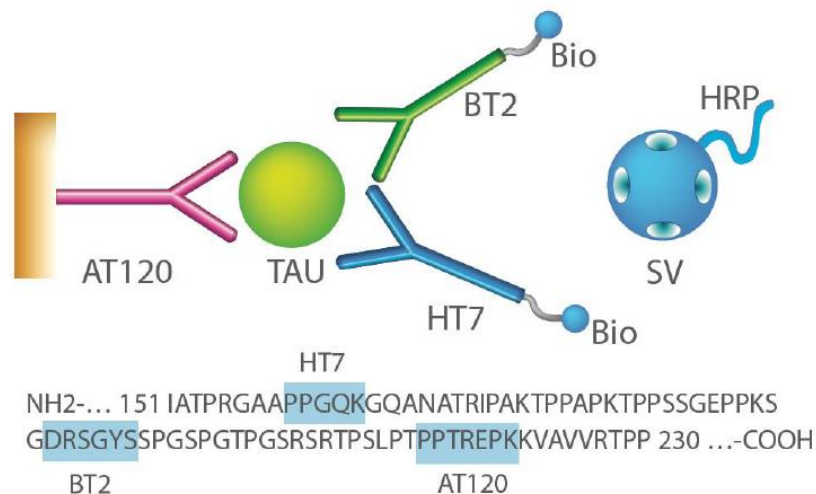
zabarvení je přímo úměrná množství p-tau ve vzorku<sup>[36]</sup>. Princip metody je znázorněn na obrázku 13.



Obrázek 13 – Princip testu INNOTEST phosfo-tau(181P); SV = streptavidin, HRP = křenová peroxidáz, Bio = biotin<sup>[36, str. 3]</sup>

#### 4.3.2 INNOTEST hTAU Ag – princip stanovení

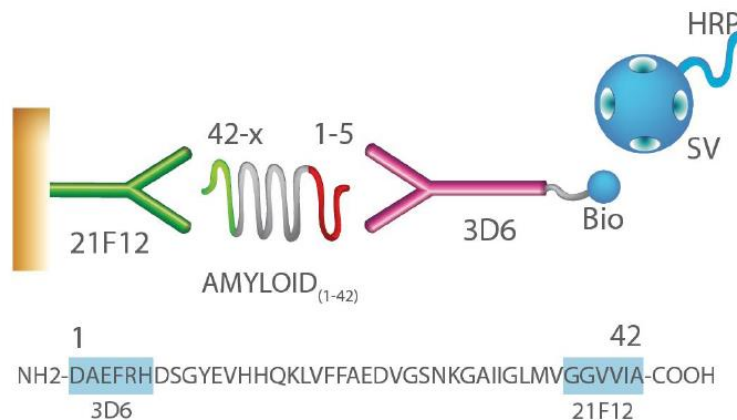
V jamkách mikrotitračních destiček je navázána monoklonální protilátka AT120 (IgG1) proti t-tau proteinu. Do jamek se přidají vzorky likvoru společně s konjugátem 1, kterým jsou dvě biotinylované protilátky HT7 a BT2. Po inkubaci, při které probíhá imunochemická reakce, se promyjí nenačnané složky. Do jamek se přidá konjugát 2, kterým je streptavidin s křenovou peroxidázou detekující komplexy antigen-protilátka (obrázek 14). Po přidavku pracovního substrátového roztoku dojde k zabarvení vzorků. Reakce se zastaví stop roztokem a do 15 minut od zastavení se měří absorbance při vlnové délce 450 nm. Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství t-tau ve vzorku<sup>[37]</sup>.



Obrázek 14 – Princip testu INNOTEST hTAU Ag, SV = streptavidin; HRP = křenová peroxidáza; Bio = biotin<sup>[37, str. 4]</sup>

#### 4.3.3 INNOTEST $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub> – princip stanovení

V jamkách mikrotitrační destičky je navázaná monoklonální protilátka 21F12 (IgG2a) proti  $A\beta$ . Do jamek se přidá vzorek likvoru společně s konjugátem 1 biotinylovanou protilátkou 3D6 (IgG2b) proti  $A\beta_{(1-42)}$ . Následuje inkubace a promytí nenavázaných složek. Komplex antigen-protilátka je pak detekován konjugátem 2 streptavidinem s křenovou peroxidázou. Po přidavku pracovního substrátového roztoku dojde k zabarvení vzorků. Reakce se zastaví stop roztokem a do 15 minut se měří absorbance při vlnové délce 450 nm. Intenzita zabarvení je přímo úměrná množství  $A\beta_{(1-42)}$  ve vzorku<sup>[35]</sup>. Princip metody je znázorněn na obrázku 15.



Obrázek 15 – Princip testu INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub>; SV = streptavidin, HRP = křenová peroxidáza, Bio = biotin<sup>[35, str. 3]</sup>

## 4.4 Chemikálie a pomůcky

Obecné složení souprav pro stanovení (tabulka 4).

Tabulka 4 – Jednotlivé složky použitých souprav INNOTEST PHOSPO-TAU<sub>(181P)</sub>(p-tau), hTAU Ag (t-tau) a β-AMYLOID<sub>(1-42)</sub>(Aβ)<sup>[35, 36, 37]</sup>

SLOŽKA SOUPRAVY	MNOŽSTVÍ	POPIS
mikrotitrační destička	1x 96	1x uzavřený vak obsahující 12 x 8 potažených testovacích jamek a sáček silikagelu (sušidlo)
ředící vzorek	1x 30 ml	fosfátový pufr se stabilizujícími proteiny a 0,01% MIT/<0,1% CAA jako konzervační činidlo
konjugát 1		
pro p-tau <sub>(181P)</sub> 100x	1x 0,3 ml	biotinylované anti-PHOSPO-TAU <sub>(181P)</sub> (AT270bio) se stabilizujícími proteiny a 0,05% Proclin 300 jako konzervační činidlo; před použitím ředíme 100x ředícím roztokem pro konjugát 1
pro t-tau 100x	1x 0,2 ml	2 monoklonální anti-hTAU protilátky značené biotinem ve fosfátovém pufru se stabilizačními proteiny a 0,03% Proclin 300 jako konzervačního činidlo; před použitím se ředí 100x ředícím roztokem pro konjugát 1
pro Aβ <sub>(1-42)</sub> 100x	1x 0,2 ml	myší anti-β-amyloid <sub>(1-42)</sub> IgG značený biotinem ve fosfátovém pufru se stabilizujícími proteiny a 0,04% MIT/<0,1% CAA jako konzervační činidlo; před použitím se ředí 100x ředícím roztokem pro konjugát 1

konjugát 2		
pro p-tau <sub>(181P)</sub> a A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> 100x	1x 0,3 ml	streptavidin značený peroxidázou obsahující 0,02% MIT a 0,02% bromitrodioxan jako konzervační činidlo; ředíme před použitím 100x ředícím roztokem pro konjugát 2
pro t-tau 100x	1x 0,2 ml	streptavidin značený peroxidázou obsahující 0,03% Proclin 300 jako konzervační činidlo; před použitím se ředí 100x ředícím roztokem pro konjugát 2
ředící roztok pro konjugát 1		
u p-tau <sub>(181P)</sub> a A $\beta$ <sub>(1-42)</sub>	1x 20 ml	barevně označený (purpurový) fosfátový pufr se stabilizačními proteiny a 0,01% MIT/<0,1% CAA jako konzervační činidlo
u t-tau	1x 30 ml	barevně označený (červený) fosfátový pufr se stabilizačními proteiny a 0,01% MIT/<0,1% CAA jako konzervační prostředek
ředící roztok pro konjugát 2		
u p-tau <sub>(181P)</sub>	1x 20 ml	barevně označený (zelený) fosfátový pufr obsahující 0,05% Proclin 300 jako konzervační činidlo
u A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> a t-tau	1x 20 ml	barevně označený (zelený) fosfátový pufr obsahující 0,05% Proclin 300 jako konzervační činidlo; hovězí kasein jako stabilizátor a hovězí aprotinin jako inhibitor proteáz

substrát TMB	1x 0,3 ml	tetrametylbenzidin (TMB) rozpuštěný v dimethylsulfoxidu (DMSO); před použitím se ředí 100x substrátovým pufrům; koncentrovaný TMB může krystalizovat, proto by měl být před použitím zcela roztaven (bod tání 18 °C)
substrátový pufr	1x 30 ml	fosfát-citrátový pufr obsahující 0,02 % peroxidu vodíku; používá se pro ředění substrátu TMB
stop roztok	1x 30 ml	0,9N kyselina sírová
promývací roztok 25x	1x 60 ml	fosfátový pufr obsahující 0,01% MIT/<0,1% CAA; před použitím se ředí 25x destilovanou nebo deionizovanou vodou; v koncentrovaném promývacím roztoku se při skladování 2-8 °C tvoří solné krystalky, tyto krystaly by se měly před použitím zcela znovu rozpustit
standardy		
standard p-tau	2x 6 lahviček (0,4 ml)	12 lahviček kalibrátorů připravených k použití
standard t-tau	2x 6 lahviček (0,2 ml)	
standard A $\beta$ <sub>(1-42)</sub>	2x 6 lahviček (0,2 ml)	
validační kontroly (VK)		
p-tau VK	2x 2 lahvičky (0,4 ml)	

t-tau VK	2x 2 lahvičky (0,2 ml)	4 lahvičky obsahující analyt v umělé matrici podobné likvoru
A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> VK	2x 2 lahvičky (0,2 ml)	

Standardy a VK jsou zabaleny odděleně, kvůli odlišným požadavkům na skladování. Po přivezení do laboratoře musejí být před použitím skladovány při teplotě -20 °C nebo méně<sup>[35, 36, 37]</sup>.

Další použité chemikálie a pomůcky, které nebyly součástí souprav:

- kalibrované pipety v rozsahu objemu 10 – 1000  $\mu$ l
- destilovaná voda
- vortex
- časovač
- buničina
- fólie na zakrytí destičky
- polypropylenové zkumavky pro přípravu roztoků (Ependorfky)
- třepačka na mikrodestičky
- inkubátor 25  $\pm$  2 °C

## 4.5 Postup

Použité komerční soupravy byly zpracovány podle návodu od výrobce. Měření absorbancí pro soupravy INNOTEST bylo provedeno na přístroji Infinite M200 Pro (Tecan Group Ltd., Switzerland).

Standardy, validační kontroly a neznámé vzorky likvoru byly měřeny v dubletu.

Příprava pracovních roztoků:



Konjugát 1 a 2 a roztok substrátu byly ředěny 100x:

- 100  $\mu$ l konjugátu 1 a 10 ml ředícího roztoku pro konjugát 1
- u P-tau se ředilo 40  $\mu$ l konjugátu 1 4 ml ředícího roztoku pro konjugát 1
- 120  $\mu$ l konjugátu 2 a 12 ml ředícího roztoku pro konjugát 2
- 120  $\mu$ l substrátu a 12 ml substrátového pufru

Promývací roztok byl ředěn 25x:

- 60 ml promývacího roztoku a 1440 ml destilované vody

Vzorky byly zpracovány na několika mikrotitračních destičkách, postup je popsán pro jednu z nich (96 jamek):

1. Do každé jamky potažené protilátkou bylo napipetováno u p-tau 25  $\mu$ l a u t-tau a A $\beta$  75  $\mu$ l naředěného konjugátu 1.
2. Poté bylo do jamek přidáno 25  $\mu$ l u t-tau a A $\beta$  a 75  $\mu$ l u p-tau standardu, validačních kontrol, neznámých vzorků a blanku.
3. Následovalo třepání 1 min při 1000 ot./min a zakrytí stripů fólií. U p-tau a t-tau se inkubovalo přes noc (14–18 hodin) v inkubátoru při 25 °C. A $\beta$  bylo inkubováno 60 minut při stejné teplotě.
4. Po inkubaci se jamky promyli 5x 400  $\mu$ l promývacího roztoku.
5. Do každé jamky bylo napipetováno 100  $\mu$ l konjugátu 2, opět se stripy zalepily a inkubovalo se t-tau a A $\beta$  30 minut a p-tau 60 minut při 25 °C v inkubátoru.
6. Po inkubaci se promývalo stejným způsobem jako v bodě 4.
7. Do jamek bylo napipetováno 100  $\mu$ l roztoku substrátu a inkubovalo se 30 minut při 25 °C ve tmě.
8. Následně byla reakce zastavena přidáním 50  $\mu$ l 0,9N kyseliny sírové (ve stejném pořadí a ve stejných časových intervalech jako u nanášení substrátu) za míchání na třepače po dobu 1 minuty při 1000 ot./min.
9. Do 15 minut od zastavení reakce byla odečtena absorbance při vlnové délce 450 nm.

Analyzátor vyhodnocoval hodnotu absorbance v každé jamce a pro každé měření analyzoval novou standardní křivku, ze které se odečítala daná koncentrace ve vzorku. Detekční limit pro soupravu t-tau byl 34 pg/ml, pro A $\beta$  65 pg/ml a pro p-tau 13 pg/ml<sup>[35, 36, 37]</sup>.

## 4.6 Statistické metody

Použitím histogramů a Sharpirova-Wilkova testu byla zjištěna přítomnost normálního i nenormálního rozložení zkoumaných ukazatelů. Většina parametrů vykazovala nenormální rozložení. Z tohoto důvodu jsem zvolila neparametrické statistické přístupy konkrétně Spearmanův korelační koeficient a Mann-Whitneyův test.

Pro statistické vyhodnocení byly použity programy Microsoft Office Excel 2007 a GraphPad Prism 8.

## 5 VÝSLEDKY

Hodnoceny byly rozdíly mezi hladinami jednotlivých proteinů likvorového tripletu u kontrolní skupiny a u skupiny pacientů s diagnostikovaným AN. Data pro zpracování byla laskavě poskytnuta doc. MUDr. Alešem Bartošem Ph.D z 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy z jeho širší studie vztahující se k vyšetření likvorové tripletu u AN. Studie byla schválena etickými komisemi Psychiatrického centra Praha (nyní Národní ústav duševního zdraví) a FN Královské Vinohrady a osoby zařazené do této studie podepsaly informovaný souhlas s účastí ve studii.

Určila jsem popisné statistiky dat (průměr, směrodatnou odchylku, medián a mezikvartilové rozpětí), které jsou uvedeny v tabulce 5. V tabulce je také uveden počet mužů a žen v jednotlivých skupinách.

Tabulka 5 – Koncentrace *t*-tau, *p*-tau<sub>(181P)</sub> a Aβ v likvoru u kontrolní skupiny (n=20) a u pacientů s AN (n=20), SD = směrodatná odchylka

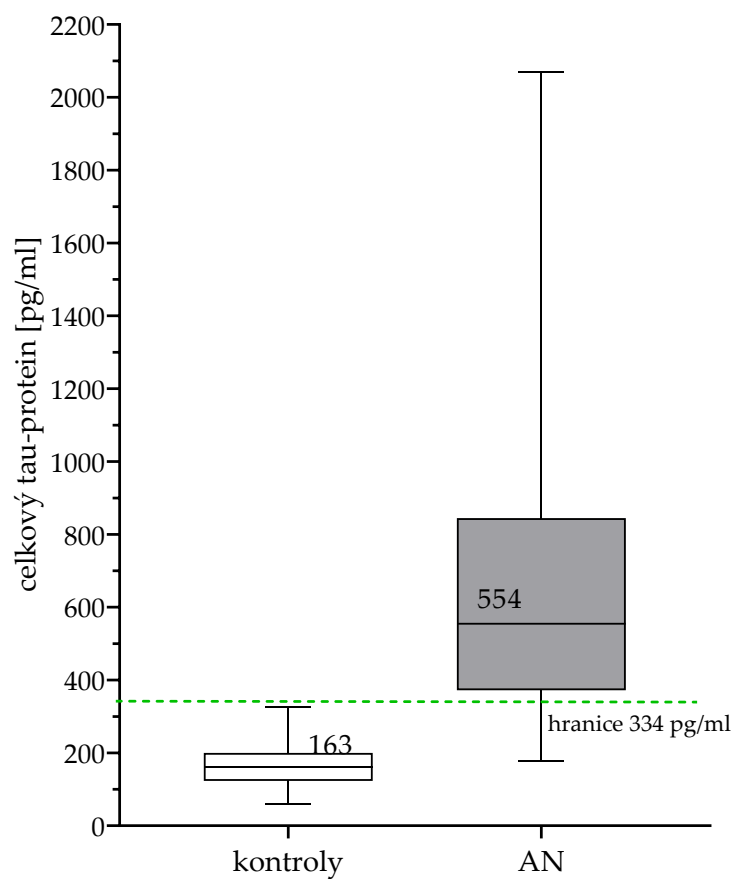
		KONTROLNÍ SKUPINA	PACIENTI S DIAGNOSTIKOVANOU AN
		<b>koncentrace v pg/ml</b>	
t-tau protein	průměr ± SD	167 ± 66	678 ± 472
	medián (mezikvartilové rozpětí)	163 (124–189)	554 (376–763)
p-tau <sub>(181P)</sub> protein	průměr ± SD	35 ± 23	57 ± 29
	medián (mezikvartilové rozpětí)	33 (18–47)	53 (38–71)
Aβ	průměr ± SD	1025 ± 348	669 ± 314
	medián (mezikvartilové rozpětí)	974 (846–1184)	547 (437–823)
		<b>počet</b>	
ženy	-	11	10
muži	-	10	9

Pro statistické vyhodnocení jsem použila Mann-Whitneyův test, který je neparametrickou analogií k dvouvýběrovému T-testu u nepárového uspořádání. Tento test porovnává mediány, tudíž nedochází k ovlivnění odlehlými hodnotami naměřených dat. Vyhodnocení tohoto testu je uvedeno v tabulce 6 a následující grafické zpracování je znázorněno na obrázcích 16–18.

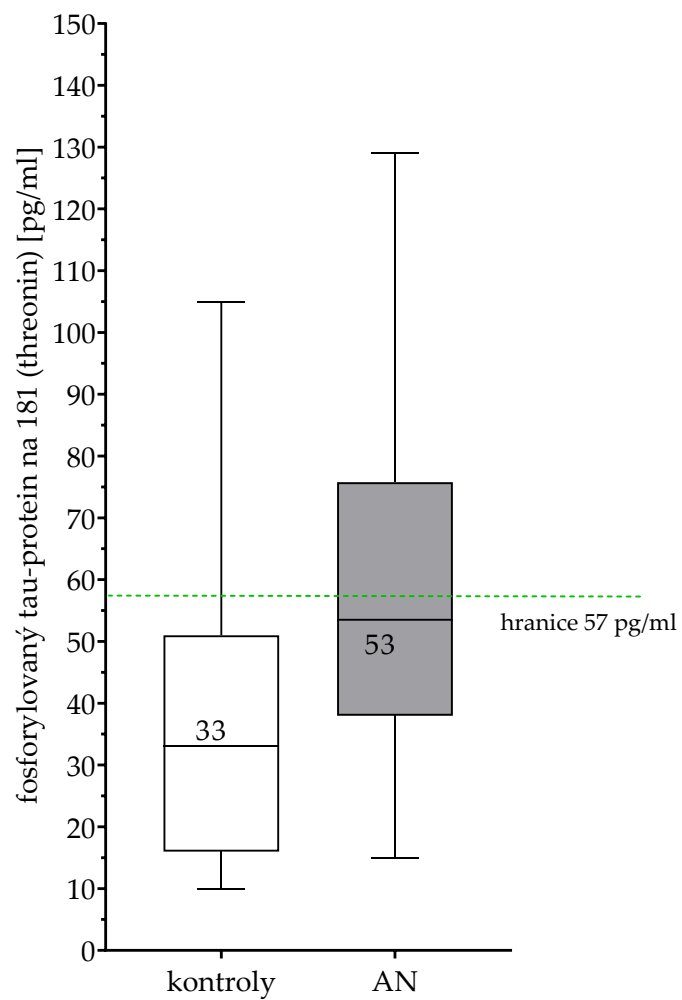
*Tabulka 6 – Shrnutí Mann-Whitneyho testu; kritérium pro hodnocení: pokud je  $U_{STAT} < U_{KRIT}$  platí, že jsou naměřené koncentrace u kontrolní skupiny a u pacientů s AN rozdílné a pokud  $\alpha(0,05) < p$ -hodnota platí, že jsou výsledky signifikantní*

	<b>statistická hodnota</b> $U_{STAT}$	<b>kritická hodnota <math>U_{KRIT}</math></b> <b>pro <math>n_1 = 20</math> a <math>n_2 = 20</math> pro</b> $\alpha = 0,05$	<b>p-hodnota</b>
t-tau protein	12	127	< 0,001
p-tau protein	101	127	0,007
A $\beta$	92	127	0,003

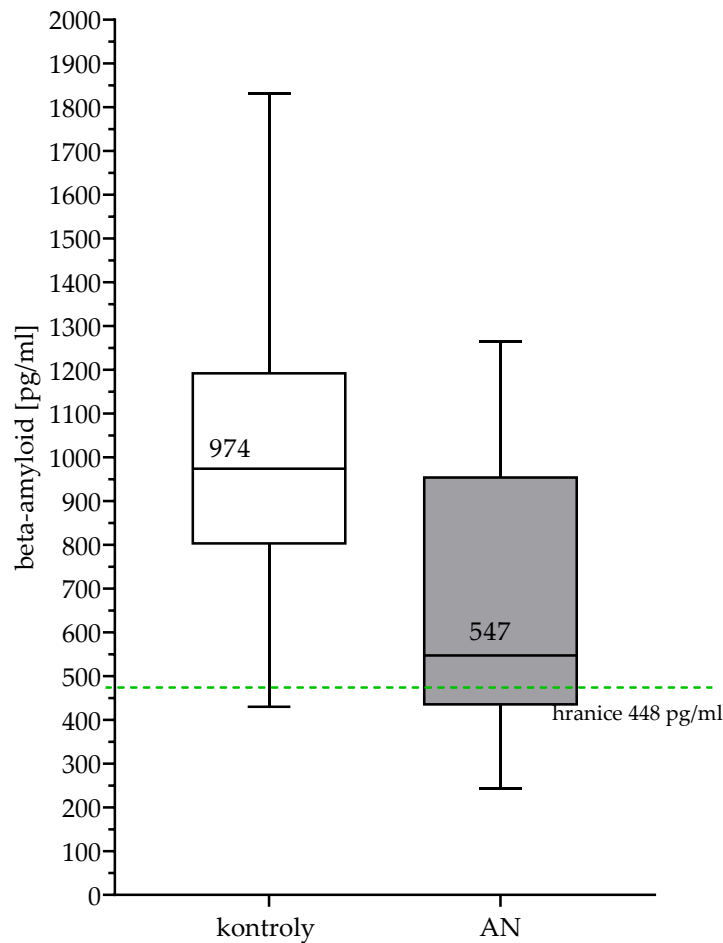
Z výsledků (tab. 5 a 6) je patrné, že koncentrace t-tau a p-tau<sub>(181)</sub> je signifikantně vyšší a koncentrace A $\beta$ <sub>(1-42)</sub> signifikantně nižší u pacientů s diagnostikovanou AN oproti kontrolní skupině.



Obrázek 16 – Grafické znázornění Mann-Whitneyho testu pomocí boxplotu; čísla vepsaná do boxů značí medián; hranice určuje hraniční koncentraci pro  $t$ -tau převzatou ze studie doc. Bartoše o likvorovém tripletu (viz. tabulka 3)



Obrázek 17 – Grafické znázornění Mann-Whitneyho testu pro p-tau; čísla vepsaná do boxů značí medián; hranice určuje hraniční koncentraci pro p-tau převzatou ze studie doc. Bartoše o likvorovém tripletu (viz. tabulka 3)



Obrázek 18 – Grafické znázornění Mann-Whitneyho testu pomocí boxplotu pro  $A\beta$ ; čísla vepsaná do boxů značí medián; hranice určuje hraniční koncentraci pro  $A\beta$  převzatou ze studie doc. Bartoše o likvorovém tripletu (viz. tabulka 3)

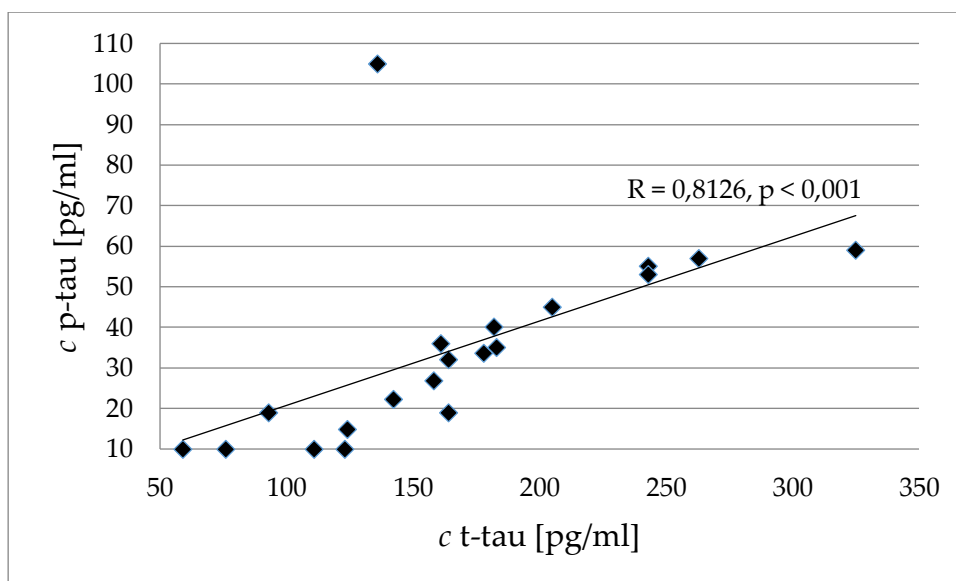
Vyhodnocením Mann-Whitneyho testu bylo prokázáno, že koncentrace veškerých vyhodnocovaných proteinů likvorového tripletu se statisticky významně liší mezi kontrolní skupinou a pacienty s AN.

Hodnoty příslušných korelačních koeficientů a korelační p-hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7. Ve skupině s AN pro korelaci mezi t-tau proteinem a  $A\beta$  a mezi p-tau proteinem a  $A\beta$  nebyla prokázána signifikance na hladině významnosti 5 %.

Tabulka 7 – Korelace mezi t-tau, p-tau(181P) a A $\beta$  u kontrolních skupin a u pacientů s AN; n – počet pacientů, R – Spearmanův korelační koeficient, p – hladina významnosti, n. s. – není signifikantní pro  $\alpha = 0,05$

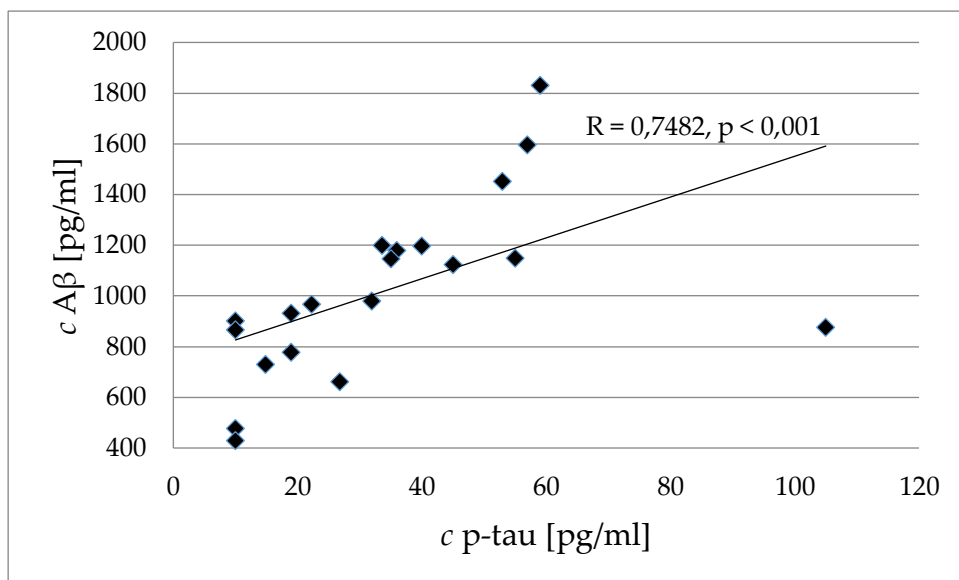
korelace mezi	n	R	p
<b>KONTROLY</b>			
t-tau vs. p-tau	20	0,8126	< 0,001
t-tau vs. A $\beta$	20	0,8894	< 0,001
p-tau vs. A $\beta$	20	0,7482	< 0,001
<b>AN</b>			
t-tau vs. p-tau	20	0,484	0,031
t-tau vs. A $\beta$	20	0,1301	n. s.
p-tau vs. A $\beta$	20	0,2199	n. s.

Na následujících obrázcích (19–24) je znázorněna korelace mezi jednotlivými proteiny tripletu v likvoru u kontrolních skupin a pacientů s AN.

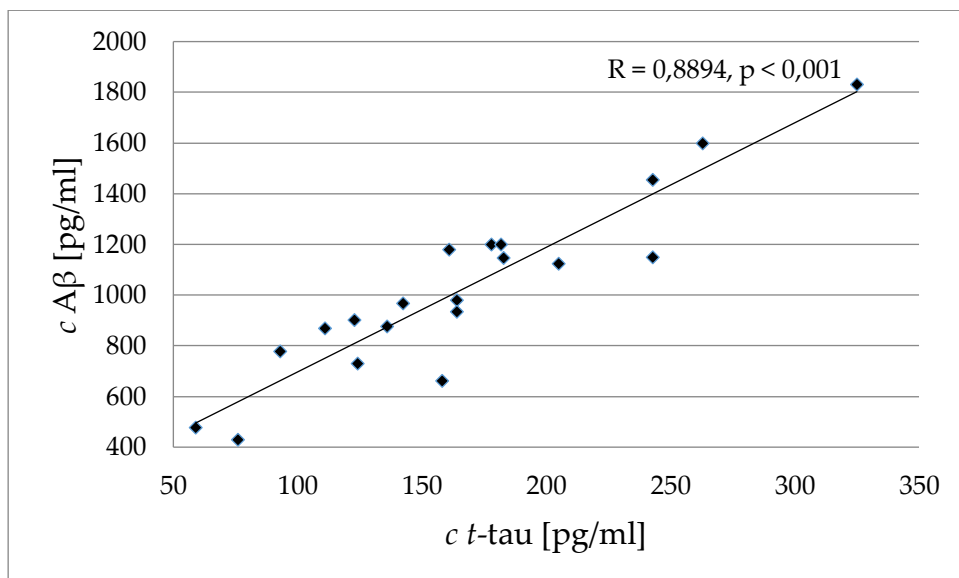


Obrázek 19 – Korelace mezi hladinami p-tau a t-tau stanovených v likvoru u kontrolní skupiny

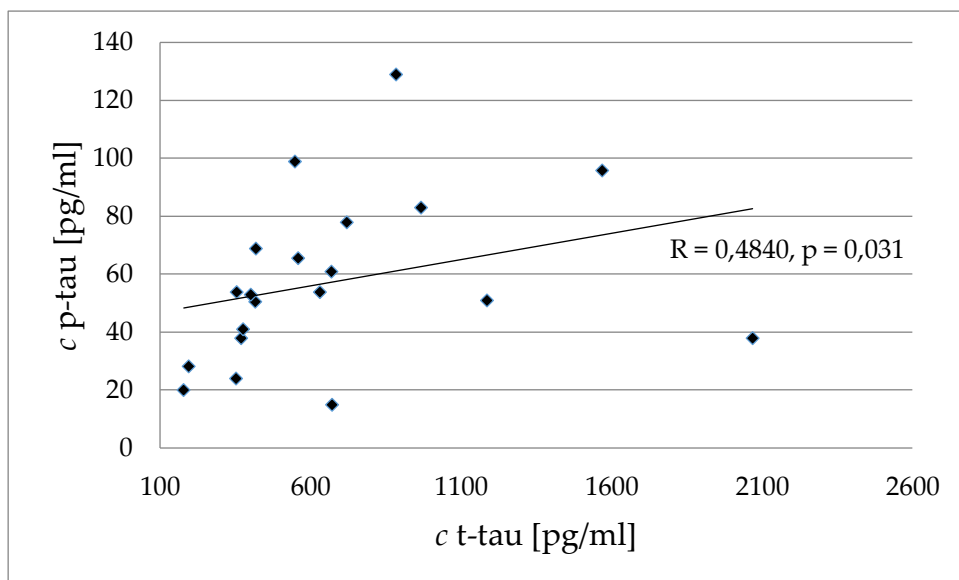




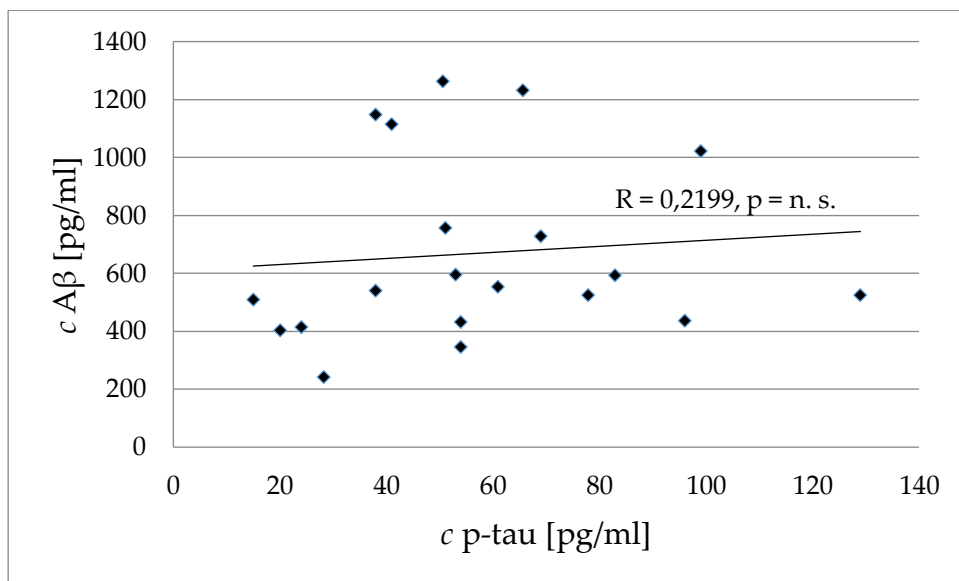
Obrázek 20 – Korelace mezi hladinami Aβ a p-tau v likvoru u kontrolní skupiny



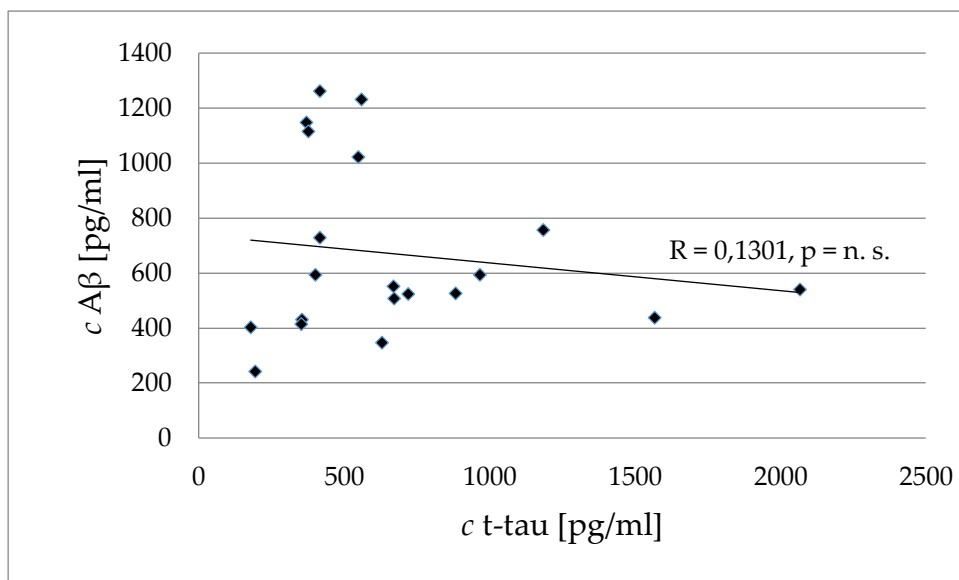
Obrázek 21 – Korelace mezi hladinami Aβ a t-tau v likvoru u kontrolní skupiny



Obrázek 22 – Korelace mezi hladinami p-tau a t-tau v likvoru u pacientů s AN



Obrázek 23 – Korelace mezi hladinami Aβ a p-tau v likvoru u pacientů s AN



Obrázek 24 – Korelace mezi hladinami Aβ a t-tau v likvoru u pacientů s AN

## 5.1 Shrnutí výsledků

Pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu byly určeny  $U_{STAT}$  a  $U_{KRIT}$  pro  $n_1=20$ ,  $n_2=20$  a  $\alpha=0,05$ , které se mezi sebou porovnaly (tabulka 6). U t-tau  $U_{STAT}(12) < U_{KRIT}(127)$ , u p-tau  $U_{STAT}(101) < U_{KRIT}(127)$  a u Aβ  $U_{STAT}(92) < U_{KRIT}(127)$ . Porovnáním těchto hodnot byl potvrzen významný rozdíl mezi naměřenými koncentracemi u kontrolní skupiny a u pacientů s AN. Po porovnání hladiny významnosti  $\alpha = 0,05$  s vypočtenou p-hodnotou, která u t-tau vyšla  $< 0,001$ , p-tau  $0,007$  a Aβ  $0,003$  se prokázala signifikance mezi jednotlivými skupinami.

Z obrázků (19–24) je patrné, že u kontrolní skupiny byla prokázána pozitivní korelace mezi p-tau vs. t-tau, p-tau vs. Aβ i u t-tau vs. Aβ. U pacientů s AN byla pozitivní korelace pouze mezi p-tau vs. t-tau. Výsledky korelace pro p-tau vs. Aβ a t-tau vs. Aβ jsou nesignifikantní. Nejslabší lineární korelace je patrná mezi hladinami Aβ a t-tau u AN (obrázek 24).

## 6 DISKUZE

Určení diagnózy AN je poměrně složitý proces, zahrnující neuropsychologické vyšetření, strukturní (MR, CT) a funkční zobrazovací metody (PET, SPECT) a vyšetření biochemických markerů v biologických tekutinách pacienta.

Používané biochemické markery odrážejí patologické změny, typické pro AN. Konkrétně dochází k ukládání intracelulárních p-tau proteinů tvořících neurofibrilární klubka a extracelulárně  $A\beta$  vytvářející amyloidové plaky<sup>[16]</sup>. Koncentrace biochemických markerů se nejčastěji vyšetřuje v likvoru a zatím v menší míře v séru pacientů. V likvoru jsou markery více specifické z důvodu přímého kontaktu s extracelulární částí mozku, ve které se v průběhu tohoto onemocnění odehrávají patologické změny.

V likvoru se v souvislosti s těmito patologickými změnami v mozku stanovuje tzv. likvorový triplet, zahrnující t-tau, p-tau a peptid  $A\beta$ <sup>[12]</sup>. První rozsáhlou studii o  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$ , t-tau a p-tau uvedla roku 1998 Japonská studijní skupina. Ve studii se poprvé tyto proteiny uvádějí jako hlavní biomarkery AN<sup>[40]</sup>.

V následujících letech se zjistilo, že u pacientů s AN dochází ke zvýšení koncentrace t-tau a p-tau a snížení koncentrace  $A\beta$  v porovnání s kontrolní skupinou<sup>[32]</sup>. Toto tvrzení jsem nejprve ověřila statistickým vyhodnocením naměřených dat.

V naší studii výsledky popisné statistiky u jednotlivých proteinů vykazovaly signifikantní rozdíly u kontrolní skupiny a u pacientů s AN (tabulka 5). Mediánové koncentrace byly u t-tau 3x a p-tau cca 1,5x vyšší než u kontrolní skupiny.  $A\beta$  bylo přibližně 2x sníženo u pacientů s AN oproti kontrolní skupině. Ze statistického zhodnocení naměřených dat vyplývá, že t-tau a p-tau se signifikantně zvyšují a  $A\beta$  se signifikantně snižuje u pacientů s diagnostikovanou AN oproti kontrolní skupině.

V zahraniční literatuře se uvádějí stejné patologické změny v likvorovém tripletu proteinů u AN<sup>[18, 20]</sup>.

Podobně i v českých studiích, hlavně ve studiích doc. Bartoše, bylo prokázáno signifikantní zvýšení u t-tau a p-tau a snížení u A $\beta$  oproti kontrolním skupinám<sup>[15]</sup>.

Porovnávala jsem lineární závislost jednotlivých markerů likvorového tripletu u kontrolní skupiny a AN (tabulka 7, obrázky 19–24). Vztahy mezi jednotlivými proteiny u kontrolní skupiny a AN se odlišovaly. Spearmanův korelační koeficient vyšel u kontrolní skupiny u všech korelací pozitivní. Velmi silné korelace byly nalezeny mezi t-tau vs. p-tau a t-tau vs. A $\beta$ , silná korelace je i u p-tau vs. A $\beta$ . Naopak u pacientů s diagnostikovanou AN se korelační koeficient mezi proteiny značně snížil. Signifikantní korelace je mezi t-tau vs. p-tau. Ale mezi p-tau vs. A $\beta$  a t-tau vs. A $\beta$  nebyla prokázána signifikance výsledků na hladině významnosti 5 %. Důvodem snížení závislosti je pravděpodobně vliv tvorby senilních plak, které tvoří A $\beta$ , jehož koncentrace se při AN snižuje. Naopak p-tau a t-tau se zvyšují.

Při vzniku AN dochází nejprve k patologickému štěpení APP  $\beta$ - a následně  $\gamma$ -sekretázami, to vede ke vzniku fragmentů neurotoxických A $\beta$ 42. Tyto fragmenty se začnou shlukovat a ukládají se do extracelulárního prostoru v kůře mozkové a tvoří senilní plaky.<sup>[23]</sup> Senilní plaky obsahující A $\beta$  jsou neurotoxické a vyvolávají tvorbu kináz, které se podílejí na fosforylaci t-tau<sup>[23, 24]</sup>. Hyperfosforylací t-tau dochází k jeho odštěpení z mikrotubulů a rozpletená vlákna se spojují do heliakálních filament, která jsou základem neurofibrilárních klubek<sup>[23, 25]</sup>.

V souvislosti s tau proteinem se popisují tzv. tautopatie. Jedná se o neurodegenerativní onemocnění, u kterých se nadměrně hromadí t-tau v mozku, v důsledku poruchy jeho vnitřního metabolismu nebo modifikace. Takto vzniklá onemocnění jsou od sebe těžko rozlišitelná, protože se projevují podobnými klinickými příznaky, hlavně demencí. V rámci diagnostiky AN je proto

specifičtějším biomarkerem p-tau, jehož hladina se zvyšuje nejčastěji v důsledku tohoto onemocnění<sup>[42]</sup>.

Vyšetření biomarkerů likvorového tripletu je tedy vysoce přínosné pro diagnostiku AN, bohužel jde o velmi invazivní vyšetření. Samotný odběr lumbální punkcí je pro pacienty nepříjemný a nedá se opakovat často. Tento odběr také musí provádět pouze neurologové a celková preanalytická fáze vyžaduje zkušenosti biochemických pracovníků v laboratořích. Významným problémem pro provádění tohoto vyšetření je i cena soupravy, která se objednává ze zahraničí a pro jednoho pacienta se cena pohybuje kolem 2 500,- Kč<sup>[41]</sup>. Je také potřeba stanovit hraniční koncentrace pro měřené proteiny likvorového tripletu. V evropských zemích je vysoká variabilita těchto hranic, proto by si je měla každá laboratoř stanovit sama podle svých podmínek a dosavadních znalostí<sup>[15]</sup>.

Z tohoto důvodu směřuje výzkum k vyšetřování biomarkerů ze séra. Stanovení ze séra má ale také své nedostatky. V séru jsou hladiny sledovaných markerů mnohem nižší než v likvoru, proto je zapotřebí měřit jejich koncentrace citlivějšími a specifitějšími imunochemickými metodami. Mezi takovéto metody například patří Simoa nebo imunoprecipitační hmotnostní spektrometrie<sup>[18]</sup>.

Hodnoty některých biomarkerů v séru jsou ovlivňovány i stavem hematoencefalitické bariéry<sup>[12]</sup> a stanovení A $\beta$  v séru není vhodné pro časnou diagnostiku AN z důvodu mutací APP nejen v mozku, ale i v krevních destičkách, které následně ovlivňují výsledek<sup>[19]</sup>.

## 7 ZÁVĚR

Předmětem práce bylo porovnat koncentrace proteinů likvorového tripletu mezi kontrolní skupinou a pacienty s diagnostikovanou AN a následně určit vztah jednotlivých proteinů mezi sebou u jednotlivých skupin. Výsledky ukázaly, že rozdíl mezi hodnotami koncentrací u kontrolní skupiny a AN je statisticky významný, a proto přínosný pro diagnostiku onemocnění.

Bylo tedy potvrzeno, že měření biochemických markerů, konkrétně likvorového tripletu u pacientů s diagnostikovanou AN ve vysoké míře napomáhá určení správné diagnózy. Pomocí proteinů t-tau, p-tau, A $\beta$  a jejich poměrů, je možné rozlišit konkrétní formu demence, nebo jiná neurodegenerativní onemocnění. Je také možné pomocí těchto markerů zachytit stádium časně AN a tak zpomalit nástup onemocnění.

Hlavní překážkou pro zařazení vyšetření mezi standardní, je invazivita odběru mozkomíšního moku lumbální punkcí a také cena soupravy pro jednoho pacienta. Řešením by mohlo být vyšetřování biomarkerů AN z jiných biologických tekutin (krev, moč). Odborníci se proto zaměřují na výzkum souvislostí mezi vznikem AN a jednotlivými markery v krvi.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AN – Alzheimerova nemoc

A $\beta$  – beta amyloid

p-tau – hyperfosforylovaný tau protein

t-tau – celkový tau protein

NIA-AA – National Institute on Aging-Alzheimer's Association

ApoE4 – apolipoprotein 4

DM – diabetes mellitus

APP – amyloid prekurzorový protein

AMK – aminokyseliny

ABAD – amyloid beta vázající alkohol dehydrogenáza

HPA – osa hypotalamus-hypofýza-kůra nadledvin

MAO – monoaminoxidázy

FAD – familiární Alzheimerova choroba

PSEN – presenilin

MAP – Microtubule-Associated Proteins

MMSE – Mini-Mental State Examination

ACE-R-CZ – Addenobrookský kognitivní test česká verze

NINCDS-ADRDA - National Institute of Neurological and Communicative Disorders – Alzheimer's Disease and Related Dementias Association

CT – výpočetní tomografie

MR – magnetická rezonance

PET – pozitronová emisní tomografie

SPECT – jednofotonová emisní výpočetní tomografie

NFL – lehké řetězce neurofilament

BACE –  $\beta$ -sekretáza

ADAM10 –  $\alpha$ -sekretáza

NTP – neuronální nitkovitý protein



NMDA – N-methyl-D-aspartátové receptory

Simoa – Single Molecule Array

IgG – imunoglobulin G

GSK-3 $\beta$  – glykogen syntáza kináza 3 $\beta$

TMB – tetrametylbendidin

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. MKN-10: Mezinárodní klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů: desátá revize.: Tabulární část: 2. opravené vydání [online]. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR 2017, 2018; 2018, s. 1-878 [cit. 2019-02-18]. ISBN 978-80-7472-168-7. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/katalog/klasifikace/mkn>
2. Livingston, Gill; Sommerlad, Andrew; Orgeta, Vasiliki; Costafreda, Sergi G; Huntley, Jonathan; et al., Dementia prevention, intervention, and care, *The Lancet*, 12/2017, 390(10 113), 2673-2734, ISSN: 0140-6736
3. Cunningham, E L, Dementia, *The Ulster medical journal*, 05/2015, 84 (2), 79-87, ISSN: 0041-6193
4. ZVĚŘOVÁ, Martina. *Alzheimerova demence*. Praha: Grada Publishing, 2017. Psyché (Grada). ISBN 978-80271-0561-8
5. RUSINA, Robert a Radoslav MATĚJ. *Neurodegenerativní onemocnění*. Praha: Mladá fronta, 2014. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3300-8.
6. KOUKOLÍK, František a Roman JIRÁK. *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha: Grada, 1998. ISBN 80-7169-615-3.
7. 2013: The prevalence of dementia in Europe: Country comparisons. *Alzheimer Europe* [online]. 2013 [cit. 2019-02-25]. Dostupné z: [https://www.alzheimer-europe.org/Policy-in-Practice2/Country-comparisons/2013-The-prevalence-of-dementia-in-Europe/\(language\)/eng-GB](https://www.alzheimer-europe.org/Policy-in-Practice2/Country-comparisons/2013-The-prevalence-of-dementia-in-Europe/(language)/eng-GB)
8. Prince M, Wimo AG M, Ali G-C, Wu Y-T, Prina M. *World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends*. London: *Alzheimer's Disease International* [online]. 2015 [cit. 2019-02-25]. Dostupné z: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>
9. POVOVÁ, Jana. *Epidemiologie a genetika Alzheimerovy choroby*. Univerzita Palackého v Olomouci, LF, Ústav preventivního lékařství, 2013. Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Vedoucí práce prof. MUDr. Vladimír Janout, CSc. Dostupné z:

- [https://theses.cz/id/iavr9d/Povova\\_DP\\_prilohy.pdf](https://theses.cz/id/iavr9d/Povova_DP_prilohy.pdf)
10. REGNAULT, Mathilde. *Alzheimerova choroba: průvodce pro blízké nemocných*. Praha: Portál, 2011, s. 15-19. ISBN 978-80-262-0010-9.
  11. Krátké kognitivní testy (do 30 minut). *AD Centrum: Centrum pro výzkum, diagnostiku a léčbu Alzheimerovy nemoci* [online]. Klecany: AD Centrum, 2015 [cit. 2019-03-21]. Dostupné z:  
[http://www.nudz.cz/adcentrum/kratke\\_kognitivni\\_testy.html](http://www.nudz.cz/adcentrum/kratke_kognitivni_testy.html)
  12. FIALOVÁ, Lenka, Aleš BARTOŠ a Jana ŠVARCOVÁ. Lehké řetězce neurofilament v séru a mozkomíšním moku a stav hematolikvorové bariéry u vybraných neurologických onemocnění. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2018, **81**(2), 185-192. DOI: 10.14735/amcsnn2018185.
  13. JIRÁK, Roman. Stará a nová diagnostická kritéria pro Alzheimerovu chorobu v podmínkách ČR. *Z pomezí neurologie* [online]. 2011, **12**(2), 135-137 [cit. 2019-03-21]. Dostupné z:  
<https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2011/02/14.pdf>
  14. ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2013. ISBN 978-80-7492-062-2
  15. Bartoš A, Čechová L, Švarcová J, Říčný J, Řípová D. *Likvorový triplet (tau proteiny a beta-amyloid) v diagnostice Alzheimerovy-Fischerovy nemoci*. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2012; 75(5): 587-594
  16. Bartoš A. *Biochemické ukazatele Alzheimerovy nemoci*. *Česká psychiatrie a svět: Sborník přednášek a abstrakt V. sjezdu České psychiatrické společnosti s mezinárodní účastí*. Galén, 2004, 5-6.
  17. Bielčiková, Pavlína. *Prezentace Atraumatická lumbální punkce*. In. *Slezská nemocnice v Opavě* [online]. [cit. 2019-03-22]. Dostupné z:  
<https://www.snopava.cz/files/neurologie/atraumaticka-lumbalni-punkce.pdf>
  18. BLENNOW, K. a H. ZETTERBERG. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *Journal of Internal Medicine*[online]. 2018, **284**(6), 643-663 [cit. 2019-03-26]. DOI:

- 10.1111/joim.12816. ISSN 09546820. Dostupné z:  
<http://doi.wiley.com/10.1111/joim.12816>
19. BARBARA, Borroni. Predicting Alzheimer dementia in mild cognitive impairment patients: Are biomarkers useful?. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2006, **545**(1), 73-80 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.06.023. ISSN 0014-2999. Dostupné z:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299906006492>
20. LÖNNEBORG, A. Biomarkers for Alzheimer Disease in Cerebrospinal Fluid, Urine, and Blood. *Molecular Diagnosis & Therapy* [online]. 2008, **12**(5), 307-20 [cit. 2019-03-24]. ISSN 11771062. Dostupné z:  
<https://search.proquest.com/central/docview/224664597?pq-origsite=summon?accountid=45351>
21. JIRÁK, Roman. Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi* [online]. 2008, **9**(4), 240-244 [cit. 2019-03-25]. Dostupné z:  
<https://www.solen.cz/pdfs/neu/2008/04/10.pdf>
22. VNOUČKOVÁ, K. a R. JIRÁK. Rivastigminum. *Remedia* [online]. 2003, **13**, 372-378 [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Rivastigminum/6-I-dW.magarticle.aspx>
23. JIRÁK, Roman. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia* [online]. 2009, **19**(5), 342-345 [cit. 2019-04-01]. Dostupné z:  
<http://www.remédia.cz/Clanky/Farmakoterapie/Farmakoterapie-Alzheimerovy-choroby/6-L-L6.magarticle.aspx>
24. Alzheimer's disease In. *Osmosis* [video online] [cit. 2019-04-01]. Dostupné z:  
[https://www.osmosis.org/learn/Alzheimer's\\_disease](https://www.osmosis.org/learn/Alzheimer's_disease)
25. KOLAROVA, Michala, Francisco GARCÍA-SIERRA, Ales BARTOS, Jan RICNY a Daniela RIPOVA. Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* [online]. 2012, **2012**, 1-13 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1155/2012/731526. ISSN 2090-8024.

Dostupné z:

<https://pdfs.semanticscholar.org/453a/7586a8cbf15176fc908face0d390f0854554.pdf>

26. Alzheimerova choroba: pravděpodobné příčiny a prevence. In: *Psychologon* [online]. Psychologický ústav FFMU, Brno, 2013, str. 59 [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: <http://www.psychologon.cz/component/content/article/14-psycholog-online/151-alzheimerova-choroba-pravdepodobne-priciny-a-prevence>
27. Alzheimer's disease brain comparison. In: *Wikipedia.org* [online]. Wikimedia Commons, 2008 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alzheimer%27s\\_disease\\_brain\\_comparison.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alzheimer%27s_disease_brain_comparison.jpg)
28. KOUDELKOVÁ, Martina. Praktické zkušenosti s laboratorní diagnostikou Alzheimerovy nemoci pomocí tau proteinu, fosfo-tau proteinu a beta amyloidu v likvoru. *Neurologie pro praxi* [online]. 2009, **10**(5), 290-293 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2009/05/05.pdf>
29. CHMALÁTOVÁ, Z. a A. SKOUMALOVÁ. Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2014, **22**(43), 189-195 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2014/2014-4/KBM-4-2014-Chmatalova-189.pdf>
30. HROUDOVÁ, Jana. Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi* [online]. 2017, **18**(1), str. 8 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://www.psychiatriepropraxi.cz/pdfs/psy/2017/01/02.pdf>
31. BERNADIČ, Marián, Juraj CISÁR a Michal BERNADIČ. Amyloidová teória v etiopatogenéze Alzheimerovej choroby. *Psychiatria - psychoterapia - psychosomatika* [online]. 2015, **22**(2), 20-27 [cit. 2019-04-04]. Dostupné z:

- <http://www.psychiatria-casopis.sk/files/psychiatria/2-2015/ppp2-2015-cla3.pdf>
32. BARTOŠ, Aleš a Daniela ŘÍPOVÁ. Pokroky v diagnostice Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi* [online]. 2007, **1**, 17-21 [cit. 2019-04-04].  
Dostupné z: <https://www.psychiatriepropraxi.cz/pdfs/psy/2007/01/04.pdf>
33. SKOUMALOVÁ, A. Periferní markery oxidačního stresu u Alzheimerovy choroby. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2011, **19(40)**, 218-222 [cit. 2019-04-05]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-4/KBM-2011-4-Skoumalova.pdf>
34. Úloha amyloidu  $\beta$  v patogenezi ACH. In: *SlidePlayer: Nemoci způsobené patologickou konformací proteinů* [online]. Jan Ilnér, Alice Skoumalová [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/2345715/>
35. INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID(1-42). *Fujirebio Europe N.V.* [online]. 2016, 1-16 [cit. 2019-04-11]. Dostupné z:  
[http://www.peramed.com/peramed/docs/81576\\_EN.pdf](http://www.peramed.com/peramed/docs/81576_EN.pdf)
36. INNOTEST PHOSPHO-TAU(181P). *Fujirebio Europe N.V.* [online]. 2016, 1-15 [cit. 2019-04-11]. Dostupné z:  
[http://www.peramed.com/peramed/docs/81574\\_EN.pdf](http://www.peramed.com/peramed/docs/81574_EN.pdf)
37. INNOTEST hTAU Ag. *Fujirebio Europe N.V.* [online]. 2016, 1-17 [cit. 2019-04-11]. Dostupné z: [http://peramed.com/peramed/docs/81572\\_EN.pdf](http://peramed.com/peramed/docs/81572_EN.pdf)
38. BARTOŠ, A., P. ZACH, F. DIBLÍKOVÁ, J. TINTĚRA, D. ŘÍPOVÁ a M. BRUNOVSKÝ. Visual rating of medial temporal lobe atrophy on magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease. *Psychiatrie*. 2007, **11**, 49-52
39. MCKHANN, Guy M., David S. KNOPMAN, Howard CHERTKOW, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011, **7(3)**, 263-269. DOI: 10.1016/j.jalz.2011.03.005. ISSN 15525260. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1552526011001014>

40. SHOJI, Mikio. Biomarkers of the Dementia. *International Journal of Alzheimer's Disease* [online]. 2011, **2011**, 1-7 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.4061/2011/564321. ISSN 2090-0252. Dostupné z:  
<http://www.hindawi.com/journals/ijad/2011/564321/>
41. Bartoš, Aleš. Prezentace Stará a nová diagnostická kritéria pro Alzheimerovu nemoc v podmínkách ČR. In. *Česká neurologická společnost* [online]. [cit. 2019-05-04]. Dostupné z:  
[https://www.czech-neuro.cz/content/uploads/2018/03/bartos\\_diagnosticka-kriteria-pro-an.pdf](https://www.czech-neuro.cz/content/uploads/2018/03/bartos_diagnosticka-kriteria-pro-an.pdf)
42. RUSINA, R., R. MATĚJ, E. RŮŽIČKA a J. ROTH. Diferenciální diagnostika tauopatií – klinický pohled. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2015, **78/111**(5), 526-535 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.14735/amcsnn2015526. ISSN 12107859. Dostupné z:  
<https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2015-5-3/diferencialni-diagnostika-tauopatii-klinicky-pohled-55994>

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Mezinárodní srovnání výskytu demence u osob starších 60 let k roku 2015 <sup>[8]</sup> .....	15
Obrázek 2 – Výskyt demence v Evropské unii k roku 2013 <sup>[4, str. 20, 7]</sup> .....	16
Obrázek 3 – Výskyt AN podle věkových skupin v EU k roku 2013 <sup>[4, str. 21]</sup> .....	17
Obrázek 4 – V levé části fyziologické štěpení APP $\alpha$ - a $\gamma$ -sekretázou (neamyloidogenní cesta), v pravé části patologické štěpení APP $\beta$ - a $\gamma$ -sekretázou vedoucí ke vzniku senilních plaků (amyloidogenní cesta) <sup>[34, str. 17]</sup> .....	19
Obrázek 5 – Na obrázku vpravo jsou zdravé neurony, obrázek vlevo znázorňuje senilní plaky a neurofibrilární klubka u AN <sup>[26]</sup> .....	21
Obrázek 6 – Vlevo mozek zdravého jedince vyššího věku, vpravo znázornění mozku, u kterého dochází k atrofii <sup>[27]</sup> .....	21
Obrázek 7 – Shrnutí neuropatologických nálezů při AN <sup>[30, str. 8]</sup> .....	23
Obrázek 8 – Zobrazovací metoda CT – vlevo obraz fyziologického stárnutí, vpravo obraz kortikální atrofie <sup>[9, str. 20]</sup> .....	29
Obrázek 9 – Zobrazení místa vpichu pro lumbální punkci <sup>[17, str. 3]</sup> .....	31
Obrázek 10 – Schéma neuronu s intracelulárními neurofibrilárními klubky a extracelulárními senilními plaky. Na obrázku jsou zároveň zobrazeny základní biomarkery AN stanovující se v mozkomíšním moku <sup>[18, str. 654]</sup> .....	32
Obrázek 11 – Histogram zobrazující věkové rozložení u pacientů s diagnostikovanou AN .....	41
Obrázek 12 – Histogram zobrazující věkové rozložení u kontrolní skupiny .....	41
Obrázek 13 – Princip testu INNOTEST phospo-tau(181P); SV = streptavidin, HRP = křenová peroxidáz, Bio = biotin <sup>[36, str. 3]</sup> .....	43
Obrázek 14 – Princip testu INNOTEST hTAU Ag, SV = streptavidin; HRP = křenová peroxidáza; Bio = biotin <sup>[37, str. 4]</sup> .....	44
Obrázek 15 – Princip testu INNOTEST $\beta$ -AMYLOID <sub>(1-42)</sub> ; SV = streptavidin, HRP = křenová peroxidáza, Bio = biotin <sup>[35, str. 3]</sup> .....	44



Obrázek 16 – Grafické znázornění Mann-Whitneyho testu pomocí boxplotu; čísla vepsaná do boxů značí medián; hranice určuje hraniční koncentraci pro t-tau převzatou ze studie doc. Bartoše o likvorovém tripletu (viz. tabulka 3).....	53
Obrázek 17 – Grafické znázornění Mann-Whitneyho testu pro p-tau; čísla vepsaná do boxů značí medián; hranice určuje hraniční koncentraci pro p-tau převzatou ze studie doc. Bartoše o likvorovém tripletu (viz. tabulka 3).....	54
Obrázek 18 – Grafické znázornění Mann-Whitneyho testu pomocí boxplotu pro $A\beta$ ; čísla vepsaná do boxů značí medián; hranice určuje hraniční koncentraci pro $A\beta$ převzatou ze studie doc. Bartoše o likvorovém tripletu (viz. tabulka 3).....	55
Obrázek 19 – Korelace mezi hladinami p-tau a t-tau stanovovaných v likvoru u kontrolní skupiny .....	56
Obrázek 20 – Korelace mezi hladinami $A\beta$ a p-tau v likvoru u kontrolní skupiny.	57
Obrázek 21 – Korelace mezi hladinami $A\beta$ a t-tau v likvoru u kontrolní skupiny..	57
Obrázek 22 – Korelace mezi hladinami p-tau a t-tau v likvoru u pacientů s AN ....	58
Obrázek 23 – Korelace mezi hladinami $A\beta$ a p-tau v likvoru u pacientů s AN .....	58
Obrázek 24 – Korelace mezi hladinami $A\beta$ a t-tau v likvoru u pacientů s AN .....	59

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 – rozdělení primárních demenci <sup>[4, str. 28-29]</sup> .....	12
Tabulka 2 – rozdělení demencí podle lokalizace <sup>[4, str. 31-32]</sup> .....	12
Tabulka 3 – Hraniční koncentrace, senzitivita a specifita u hlavních markerů stanovovaných v likvoru zjištěné dlouholetým výzkumem doc. Bartoše <sup>[15]</sup> .....	33
Tabulka 4 – Jednotlivé složky použitých souprav INNOTEST PHOSPO-TAU <sub>(181P)</sub> (p-tau), hTAU Ag (t-tau) a $\beta$ -AMYLOID <sub>(1-42)</sub> (A $\beta$ ) <sup>[35, 36, 37]</sup> .....	45
Tabulka 5 – Koncentrace t-tau, p-tau <sub>(181P)</sub> a A $\beta$ v likvoru u kontrolní skupiny (n=20) a u pacientů s AN (n=20), SD = směrodatná odchylka .....	51
Tabulka 6 – Shrnutí Mann-Whitneyho testu; kritérium pro hodnocení: pokud je $U_{STAT} < U_{KRIT}$ platí, že jsou naměřené koncentrace u kontrolní skupiny a u pacientů s AN rozdílné a pokud $\alpha(0,05) < p$ -hodnota platí, že jsou výsledky signifikantní.....	52
Tabulka 7 – Korelace mezi t-tau, p-tau <sub>(181P)</sub> a A $\beta$ u kontrolních skupin a u pacientů s AN; n – počet pacientů, R – Spearmanův korelační koeficient, p – hladina významnosti, n. s. – není signifikantní pro $\alpha = 0,05$ .....	56

