

PŘEHLED ZNÁMÝCH FLUIDNÍCH BIOMARKERŮ NEURODEGENERATIVNÍCH ZMĚN V MOZKU U ALZHEIMEROVY CHOROBY A MOŽNOSTI JEJICH VYUŽITÍ

souborný článek

Martina Zvěřová^{1,2}

¹Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN, Praha

²Nemocnice Na Homolce, Praha

Kontaktní adresa:

MUDr. Martina Zvěřová, Ph.D.
Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN
Ke Karlovu 11
120 00 Praha 2
e-mail: martina.zverova@vfn.cz

Podpořeno programem PROGRES Q27/LF1 „Neuropsychiatrické aspekty neurodegenerativních onemocnění“ a grantem GA ČR č. 17-05292S „Nové krevní biomarkery pro včasnou diagnostiku, prognózu a průběh Alzheimerovy nemoci“.

SOUHRN

Zvěřová M. Přehled známých fluidních biomarkerů neurodegenerativních změn v mozku u Alzheimerovy choroby a možnosti jejich využití

Alzheimerova choroba je ireverzibilní neléčitelné progresivní neurodegenerativní onemocnění, kdy v průběhu let dochází k postupnému zhoršování příznaků demence. Předmětem výzkumu je vývoj spolehlivých, dostatečně citlivých, neinvazivních a nákladově efektivních diagnostických biomarkerů (genetických, biochemických, fyziologických, neuroendokrinních či jiných biologických), které by pomohly k časné diagnostice Alzheimerovy demence, nebo k predikci odezvy na farmakoterapii. Biochemické markery včetně těch neurovizuálních by mohly jednak usnadnit diagnostiku, predikovat přechod preklinického stadia mírné kognitivní poruchy do vlastního onemocnění, jednak by mohly sloužit ke zjišťování výhod nemoc modifikující terapie. Zavedené likvorové biomarkery AD a neurovizuální biomarkery jsou sice velmi přesné, ale narážejí na jisté hranice pro jejich jednoduché zavedení do klinické praxe. V posledních desetiletích se proto pozornost zaměřila na plazmatické biomarkery. Ideální diagnostický test Alzheimerovy choroby by měl být neinvazivní a jednoduše aplikovatelný. Je rovněž nutné brát v potaz ekonomické náklady.

SUMMARY

Zvěřová M. A review of known fluid biomarkers of neurodegeneration in Alzheimer's disease and contexts of use

Alzheimer's Disease (AD) is an irreversible, incurable, progressive neurodegenerative illness, where dementia symptoms gradually worsen over a number of years. The research of validated biomarkers for Alzheimer's disease is essential to improve diagnosis and accelerate the development of new therapies. Biochemical markers including neuroimaging could facilitate diagnosis, predict AD progression from a pre-AD state of mild cognitive impairment (MCI), and be used to detect efficacies of disease-modifying therapies. Established biomarkers of AD from cerebrospinal fluid (CSF) and neuroimaging are highly accurate, but barriers to clinical implementation exist. The focus on blood-based AD biomarkers has grown exponentially during the past decades. An ideal diagnostic test for AD should be non-invasive and easily applicable. Clinical cost-effectiveness also needs to be established.

Key words: Alzheimer's disease, biochemical markers, cerebrospinal fluid, beta amyloid

Článek přináší přehled známých fluidních biomarkerů Alzheimerovy choroby a možností jejich využití.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba, biochemické markery, likvor, beta amyloid.

ÚVOD

Alzheimerova choroba (Alzheimer's Disease – AD) je závažné progresivní a ireverzibilní neurodegenerativní onemocnění, které zasahuje do života celé pacientovy rodiny. Jde o nejčastěji se vyskytující formu demence, s prevalencí 1 % populace a je čtvrtou až pátou nejčastější příčinou smrti. Alzheimerova choroba patří mezi infaustní onemocnění, včasnou léčbou však lze její průběh podstatně zpomalit, a zejména udržet pacienty v lehčích stádiích demence. Kauzální terapie v současnosti neexistuje. S postupem choroby se pacient stává plně závislým na péči druhých osob. Onemocnění vede ve svém důsledku k obrazu těžké intelektové deteriorace. Charakteristickým rysem nemoci je nenápadný plíživý začátek, kdy si prvních příznaků povšimne spíše okolí než samotný pacient. Na počátku onemocnění jsou obvyklé diskrétní změny afektivity typu anxiety, iritability, deprese a apatie. Klinický obraz choroby je podmíněn kortikální degenerací, pro kterou je typická porucha všípivosti s výpadky paměti na nedávno proběhlé události. Postupně dochází i k postižení nekognitivních funkcí. Patogeneze vzniku této nemoci není dosud uspokojivě objasněna, hlavním etiopatogenetickým činitelem je pravděpodobně atrofie mozku, doprovázená řadou chorobných změn. Hypotéz o vzniku nemoci je celá řada, přičemž některé zavržené se dostávají znovu do popředí zájmu. I když jsou známy jednotlivé články neurodegenerace, zatím nám unikají vzájemné souvislosti a základní spouštěcí mechanismus. Předpokládá se, že stěžejním mechanismem, který vede ke jmenovaným dějům, je zejména tvorba a ukládání beta-amyloidu (Aβ).¹

Přes velký pokrok, který byl dosažen jak v porozumění patofyziologii a průběhu Alzheimerovy nemoci, tak ve vývoji nových laboratorních i zobrazovacích metod, kdy se prosadila neuroprotektivní strategie její léčby, nebyla zatím vyvinuta žádná nová metoda pro biochemickou diagnostiku AD, průkazná a pro pacienty méně zatěžující než odběr mozkomíšního moku. Předmětem výzkumu je tak vývoj spolehlivých, dostatečně citlivých, neinvazivních a nákladově efektivních diagnostických biomarkerů (genetických, biochemických, fyziologických, neuroendokrinních či jiných biologických), které by pomohly k časné diagnostice Alzheimerovy demence, nebo k predikci odezvy na farmakoterapii. Stále zůstává hlavním diagnostickým nástrojem klinické pozorování, vlastní psychiatrické a neuropsychologické vyšetření spolu se zhodnocením informací od příbuzných nemocného.

1. Fluidní biomarkery k průkazu amyloidové patologie

a) likvor

Primárním zdrojem beta-amyloidu je amyloidový prekursorový protein (APP). Jak bylo popsáno výše, za fyziologických podmínek je štěpen alfa-sekretázou na fragmenty o 39–40 (výjimečně 42) aminokyselinách. Tyto fragmenty (beta-peptidy) působí za normálních podmínek neuroprotektivně a jsou rozpustné. Za patologických okolností je transmembránový APP (typ I) v synaptických váčcích postupně štěpen enzymy beta a gama-sekretázou na delší fragmenty o 42 (Aβ₄₂), popřípadě 43 aminokyselinách a více. (APP je metabolizován i v jiných typech buněk, ale k nejvyšší sekreci Aβ₄₂ dochází v neuronech a pravděpodobně souvisí se synaptickou aktivitou). Tyto fragmenty nejsou solubilní, navzájem se spojují v silně neurotoxické oligomery, posléze v delší vlákna – fibrily. Ty koagulují v extracelulárních prostorech kortexu a polymerují v beta-amyloid.² Beta-amyloid se ukládá v neuropilu, kde vytváří tzv. amyloidové plaky (jejich hlavní součástí je Aβ₄₂).

Aβ₄₂ lze v likvoru měřit např. metodou ELISA (analytická metoda využívaná ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů, enzyme-linked immunosorbent assay) nebo pomocí hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry). Bylo opakovaně prokázáno, že oproti kontrolám mají pacienti s AD v likvoru sníženou koncentraci Aβ₄₂. Toto snížení koncentrace je známkou ukládání Aβ₄₂ do senilních plaků, což lze verifikovat pitvou a *in vivo* pomocí zobrazovací metody PET (zobrazování amyloidových plaků). Koncentrace Aβ₄₂ v CSF je již změněna u mírné kognitivní poruchy (MCI) a u preklinického stadia AD. Tuto změnu vidíme i u nemoci s Lewyho tělísky (DLB), jelikož je také charakterizovaná agregací beta amyloidu v mozku.³

b) Krev

Stanovit krevní biomarkery, které by prokazovaly přítomnost amyloidových plaků v mozku, je velmi obtížné. Beta amyloidové proteiny je jistě možné měřit v plazmě, ale korelace s přítomností beta amyloidu v mozku je nulová nebo velmi slabá (statisticky významná, ale klinicky nevýznamná). Navíc je pravděpodobně hodnota koncentrace beta amyloidu v plazmě ovlivněna jeho produkcí destičkami nebo jinými tkáněmi. Pilotní data navíc ukazují, že amyloidová nálož v mozku je asociována se změnami plazmatických koncentrací dalších proteinů (např. jde o pankreatický polypeptid Y, IgM, chemkinový ligand 13, interleukin 17, vaskulární protein 1, alfa 2 makroglobulin, apolipoprotein A1 a proteiny komplementu). Je nutné tato data interpretovat s velkou

opatrnosti, protože se jedná o multimerový panel možných biomarkerů, přesná souvislost mezi nimi a přítomností amyloidových plaků v mozku však zatím není zřejmá.³

2. Fluidní biomarkery k průkazu tau patologie (přítomnost neuronálních klubíček)

Jak již bylo uvedeno výše, toxicita AB pravděpodobně vyvolává degeneraci dalšího intraneuronálního proteinu – tau-proteinu. Tau-protein se v defosforylovaném nebo částečně fosforylovaném stavu váže na mikrotubuly, které zpevňuje. Za patologických okolností jsou z tau-proteinu odštěpovány krajní aminokyseliny a dochází k jeho hyperfosforylaci. To dále vede k rozvláknění proteinu a následnému spojování jeho vláken do párově heliakálních filament (PHF). Intracelulární depozice neurofibrilárních plaků narušuje cytoarchitektoniku buňky a tím způsobuje její smrt.⁴ Hyperfosforylovaný tau-protein je základní komponentou různých patologických útvarů (tzv. tangles, klubíčka) nalezených v neuronech pacientů trpících poruchami, které nazýváme souhrnným názvem tauopatie.

a) likvor

Pomocí metody ELISA bylo zjištěno, že pacienti s AD mají v likvoru vyšší koncentrace celkového tau-proteinu nebo zvýšenou koncentraci fosforylovaného tau-proteinu (CSF P-tau), než mají kontroly. P-tau koncentrace v likvoru, jak bylo mnohokrát doloženo pomocí PET metody, slabě koreluje s intracelulární depozicí neurofibrilárních plaků u AD pacientů. Zajímavou a dosud nevyjasněnou otázkou zůstává, proč u ostatních tauopatií (např. FTD nebo supranukleární obrny) také nedochází ke zvýšení CSF – P tau, přinejmenším k tak zřetelné soustavnému zvyšování, jaké vidíme u AD. Pravděpodobně dochází k tau fosforylaci, která je pro danou nemoc specifická, případně u těchto nemocí dochází k degeneraci tau-proteinu cestou, kterou neumíme ještě dostupnými metodami zachytit. Jednoduchým, ale zatím nepotvrzeným vysvětlením by bylo to, že k degeneraci tau, specifické pro AD, dochází v mnohem větší míře než u ostatních tauopatií. V současnosti je CSF – P tau považován za nejspecifičtější biomarker AD, neboť s výjimkou herpetické encefalitidy a superficiální CNS siderózy u žádného jiného onemocnění nedochází k tak soustavnému zvyšování tohoto biomarkeru.

b) Krev

K průkazu neuronálních tangles nejsou v současnosti známy žádné krevní biomarkery, nicméně výzkum se zaměřuje na zjišťování P-tau koncentrace v neuronálních exosomech sledovaných v krvi. Má se za to, že extracelulární váčky (exosomy) by se mohly podílet na šíření chybně poskládaných proteinů mezi buňkami i u neurodegenerativních chorob.

3. Fluidní biomarkery k průkazu neurodegenerace

a) likvor

Hladina celkového tau (T-tau), měřeného např. pomocí metody ELISA, může sloužit jako hlavní marker neuro-

degenerace u Alzheimerovy nemoci. Pacienti s tímto onemocněním mají, proti kontrolám, zvýšenou koncentraci CSF T-tau, a čím vyšší je koncentrace, tím závažnější je neurodegenerativní proces. Nicméně CSF T-tau zvýšení není specifické pro AD, jeho zvýšení vidíme např. také u Creutzfeldovy-Jacobovy choroby (CJD). Neuronálně specifická enoláza (NSE) byla považována za možného kandidáta na AD biomarker, ale její asociace s AD je nejednoznačná. Dalším pravděpodobným CSF biomarkerem neurodegenerace je, jak naznačují novější studie, hladina lehkých řetězců neurofilament. Hladiny řetězců neurofilament jsou v biologických tekutinách zkoumány jako možné biomarkery vypovídající o narušení axonálních struktur, které doprovázejí různá neurologická onemocnění.⁵

Neurofilamenta jsou součástí neurocytoskeletálních struktur přítomných v tělech i ve výběžcích neuronů centrálního a periferního nervového systému. Heteropolymerní struktura neurofilament je tvořena třemi hlavními podjednotkami: lehkými (NFL), středními (NFM) a těžkými řetězci (NFH), které označujeme jako tzv. neurofilamentový triplet. V neurofilamentech jsou nejvíce zastoupeny lehké NFL řetězce, jsou přítomny v každém neurofilamentu společně s NFH nebo NFM a soustředí se zejména do axonální oblasti. Při poškození axonů se mohou jednotlivé řetězce neurofilament uvolňovat do extracelulárního prostoru, nejsnadněji, a tedy i nejrychleji, se do likvoru uvolňují NFL řetězce, protože z tzv. neurofilamentového tripletu mají nejnižší molekulovou hmotnost. První studie se orientovaly na stanovení hladin jednotlivých řetězců neurofilament v likvoru. V současnosti lze sledovat, díky zavedení citlivějších imunoanalytických metod, hladiny neurofilamentových řetězců i v séru/plazmě, v nichž jsou koncentrace výrazně nižší. Kromě likvorového tripletu umožňuje hladina lehkých řetězců neurofilament odlišit pacienty s AD od kontrol. Zvýšení jejich hladin je průkazné jak v likvoru, tak i v plazmě/séru.⁵

Zvýšené hladiny CSF NFL byly zjištěny zejména u pacientů s AD s rychlým průběhem onemocnění, nejvyšší hladiny však byly nalezeny (u pacientů se symptomy demence) u nemocných s FTD a u pacientů s vaskulární demencí (VD) nebo u nemocných s nemocemi parkinsonského typu. Tak jako u T-tau proteinu nalézáme nejvyšší hladiny NFL v likvoru u nemocných s CJD.³

b) krev

Tau koncentrace byla vyšší v plazmě než v séru (důvod není znám). Korelace s výsledky získanými v likvoru byla nicméně slabá nebo žádná. Plazmatická koncentrace T-tau u pacientů s AD byla zvýšena, ale méně než koncentrace T-tau v likvoru a jeho zvýšení nebylo detekovatelné ve fázi mírné kognitivní poruchy.³ Při některých neurologických onemocněních dochází k porušení hematocelulární bariéry nebo (HEB) hematolikorové bariéry (HLB). To může způsobit problém při stanovení proteinů mozku v séru – jejich hladiny v krvi mohou být tímto porušením ovlivněny. Vztah mezi hladinami NFL v séru a mozkomíšním moku je v literatuře popisován opakovaně.³ V dosud publikovaných studiích převažují nálezy pozitivní korelace hladin NFL mezi oběma biologickými tekutinami, ale objevují se i nálezy negativní, kde vztah není prokázán. V nejnovějších studiích se k analýze séra

používá citlivějších (a finančně velmi náročných) metod na bázi Simoa (single-molecule array), pomocí nichž jsou zejména v oblasti nižších koncentrací NFL v séru získávány přesnější výsledky. Použitím citlivějších metod pro stanovení NFL (jako je Simoa, popř. elektrochemiluminiscence) je dosahováno vyšších hodnot korelačních koeficientů pro srovnání hladin NFL v séru a mozkomíšním moku. Novější studie naznačují, že NFL v plazmě by mohla představovat neinvazivní biomarker neurodegenerace vč. AD.⁵

4. Fluidní biomarkery k průkazu synaptické patologie

a) likvor

Neurogranin (Ng) je synaptický dendritický protein, angažující se v dlouhodobé potenciaci synapsí zejména v hipokampu a v pulvinaru.

Z nedávno publikovaných studií vyplývá, že koncentrace Ng v likvoru byla vyšší u pacientů s AD než u zdravých kontrol, ale nebyla zvýšena u jiných neurodegenerativních nemocí. Bylo zjištěno, že tento marker predikuje do budoucna kognitivní zhoršení, mozkovou atrofii a snížení glukozového metabolismu v prodromálních stádiích onemocnění. V současnosti patří CSF Ng k nejlépe prokázaným biomarkernům k průkazu synaptické ztráty nebo dysfunkci u AD.

b) krev

V současnosti nejsou známe relevantní biomarkery. U pacientů s AD je ve srovnání se zdravými kontrolami hladina neurograninu v krvi nezměněna.

5. Fluidní biomarkery ke zjištění stavu hematolikvorové a hematoencefalické bariéry

Moderní způsob testování biomarkerů původem z mozkové tkáně směřuje k jejich vyšetřování v séru, které by nahradilo jejich stanovení v mozkomíšním moku. Určitou nevýhodou může být, že hodnoty některých biomarkerů v séru mohou být ovlivňovány i stavem bariér – hematoencefalické bariéry (HEB) nebo hematolikvorové bariéry (HLB) – v nervovém systému. Přestože byla provedena celá řada studií, ani v CSF, ani v krvi nebyly dosud nalezeny průkazné biomarkery pro zjišťování stavu bariér v nervovém systému. Původní kandidát – membránový protein okcludin – byl zavržen, protože není specifický pro mozek (vyskytuje se ve vysokých hladinách v játrech, ledvinách a plicích).

ZÁVĚR

Přes veškerý pokrok zůstává dosud etiologie a etiopatogeneze Alzheimerovy choroby neznámá. Riziko vzniku AD je asociováno řadou biochemických parametrů a genetických variant.

Mezi hypotézy vzniku Alzheimerovy demence provázené neurodegenerací a kognitivním postižením patří hypotéza cholinergní (snížená syntéza acetylcholinu), amyloidová (abnormální akumulace amyloidu-beta) a tau (patologická agregace tau-proteinu). Pozornost je však věnována řadě dalších faktorů, které mohou být zahrnuty v etiologii AD, především mechanismům vedoucím k poškození neuroplasticity a neurogeneze, indukci apoptózy, poruchám v buněčné energetice a mitochondriálním dysfunkcím. Známý je podíl genetické variability na vzniku a progresi AD.

Jedním z předmětů výzkumu tohoto onemocnění je vývoj spolehlivých, citlivých, neinvazivních a nákladově efektivních diagnostických biomarkerů, které by mohly být použity pro diagnostiku a sledování progresu onemocnění. Kvůli dostupnosti a nízké zátěži při odběru vzorků se u lidí tyto biomarkery hledají především v periferní krvi. V oblasti aktivních biomolekul se očekává nalezení nových biomarkerů na základě biochemických, proteomických a metabolických analýz plazmy a dalších složek krve či tkání. V oblasti genetických změn jsou prováděny klasické případové a celogenomové asociační studie. Na buněčné úrovni jsou studovány změny v nitro-buněčných signálních cestách, membránovém a váčkovém transportu a funkci organel, především mitochondrií.

Triplet proteinů (amyloid-beta 1-42, tau-protein a fosforylovaný tau-protein) v likvoru již běžně slouží jako biomarkery, které reflektují klíčovou patologii u AD a jejichž stanovování se ve specializovaných laboratořích provádí celosvětově: T-tau, prokazující zejména přítomnost neurodegenerace, P-tau, prokazující fosforylaci tau-proteinu a přítomnost tangles, a Aβ42, který nepřímo koreluje s přítomností amyloidových plaků v mozku. V kombinaci s revidovanými kritérii pro AD umožňují tyto biomarkery přesnější diagnostiku nemoci a napomáhají k detekci onemocnění v jeho časných stádiích.³

Potíže v identifikaci specifických biomarkerů AD spočívají mimo jiné ve skutečnosti, že s rostoucím věkem se zvyšuje výskyt různých onemocnění, a je proto obtížnější rozlišit specifické biomarkery AD. Předpokládá se, že bude nutné studovat obsáhlejší panel vhodných biomarkerů, jejichž současný výskyt by detekoval AD a její progresi s dostatečnou citlivostí a specificitou. Stále jsme spíše ve fázi hledání vhodných biomarkerů. Nabízí se i otázka, jak biomarkery jednoduše implementovat do klinického vyšetřování, a otázka financování takového vyšetření.

LITERATURA

1. Zvěřová M. Alzheimerova demence. Praha: Grada Publishing 2017.
2. Fišar Z, Jiráček R. Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie. 2. přepracované vydání. Praha, Grada Publishing 2011.
3. Zetterberg H. Applying fluid biomarkers to Alzheimer's disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 2017; 313 (1): C3–C10. [PMC free article] [PubMed]
4. Yaari R, Corey-Bloom J. Alzheimer's Disease: Pathology and Pathophysiology [online] 2007 [cit. 2011-11-27]. Dostupné z: http://www.medscape.com/viewarticle/553256_2.
5. Fialová L, Bartoš A, Švarcová J. Lehké řetězce neurofilament v séru a stav hematolikvorové bariéry u vybraných neurologických onemocnění. *Cesk Slov Neurol N* 2018; 81 (2): 185–192.