

# REVIEWS

Adv Clin Exp Med 2006, 15, 6, 1121–1127  
ISSN 1230-025X

© Copyright by Silesian Piasts  
University of Medicine in Wrocław

WANDA DOBRYSZYCKA<sup>1</sup>, JERZY LESZEK<sup>2</sup>

## Laboratory Diagnostics of Alzheimer's Disease

### Diagnostyka laboratoryjna choroby Alzheimerera

<sup>1</sup> Chair and Department of Pharmacological Biochemistry, Silesian Piasts University of Medicine, Wrocław, Poland

<sup>2</sup> Chair and Department of Psychiatry, Silesian Piasts University of Medicine, Wrocław, Poland

#### Streszczenie

Przedstawiono cechy idealnego biomarkera w diagnostyce laboratoryjnej choroby Alzheimerera. Wskazano na zastosowanie współczesnych technik neuroobrazowania: jądrowego rezonansu magnetycznego, fotonowej tomografii emisyjnej, pozytonowej tomografii emisyjnej i komputerowej tomografii perfuzyjnej. Wśród biomarkerów oznaczanych głównie w płynie mózgowo-rdzeniowym, największe znaczenie w diagnostyce mają peptydy amyloidowe A $\beta$ 1-42, zwłaszcza w kombinacji z białkiem tau całkowitym lub hiperfosforylowanym. Mimo nowych proteomicznych nanotechnologii laboratoryjnych, nadal brakuje właściwego modelu powiązania neurobiologii klinicznej z fenotypami choroby Alzheimerera oraz współzależności zmian biochemicznych/molekularnych z objawami klinicznymi (*Adv Clin Exp Med 2006, 15, 6, 1121–1127*).

**Słowa kluczowe:** choroba Alzheimerera, płyn mózgowo-rdzeniowy, neuroobrazowanie, peptydy A $\beta$ 1-42, białko tau, nanotechnologie.

#### Abstract

Features of an ideal biomarker in laboratory diagnostics of Alzheimer's disease (AD), are given. Contemporary molecular imaging probes as magnetic resonance, photon emission tomography (SPECT), positron emission tomography (PET) and computer perfusion tomography (pCT), are shown. Among biomarkers, determined mainly in the cerebrospinal fluid relatively the highest significance in AD diagnosis reveal amyloid peptides A $\beta$ 1-42, especially in combination with tau protein total and hiperfosforylated. In spite of new proteomic laboratory nanotechnologies, there is lack of an appropriate relationships between neurobiology and clinical phenotypes of AD as well as conceptual model of complex connection between biochemical/molecular changes and the clinical symptoms of the disease (*Adv Clin Exp Med 2006, 15, 6, 1121–1127*).

**Key words:** Alzheimer's disease, cerebrospinal fluid, neuroimaging, peptides A $\beta$ 1-42, protein tau, nanotechnologies.

Choroba Alzheimerera (ch. A.) jest najczęstszą przyczyną otępienia w podeszłym wieku, prowadząc do upośledzenia pamięci oraz innych funkcji poznawczych oraz zmian osobowości; uniemożliwia choremu samodzielne funkcjonowanie i kończy się śmiercią. Choroba powoduje charakterystyczne zmiany neurozwyrodnieniowe w mózgu, które dotyczą przede wszystkim komórek centralnego układu nerwowego: neuronów (przekazywanie impulsów nerwowych) i komórek glejowych (ochrona i wsparcie neuronów).

W mózgu pacjentów z ch. A. powstają zwyrodnienia włóknkowe w strukturach śródneuronalnych (NFT – *neurofibrillary tangles*) i nici neuropilowe (NT – *neuropil threads*). Pozakomórkowe

wytrącenia nierozpuszczalnych białek amyloidu  $\beta$  (A $\beta$ ) są centrami tzw. blaszek starczych. Blaszka amyloidowa składa się głównie z 39–43 reszt aminokwasowych tworzących hydrofobowy peptyd A $\beta$ , powstały śródneuronalnie przez proteolizę z dużego transbłonowego 140-aminokwasowego prekursora (APP – *amyloid precursor protein*). Proteoliza APP odbywa się w kompleksie proteasomu, w którym biorą udział  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -sekreazy i dwa białka zwane presenilinami (PS) 1 i 2. Peptydy 42- i 43-aminokwasowe są głównymi składnikami blaszek starczych i czynnikami zapoczątkowującymi powstawanie złogów amyloidowych. W cytotoksyczności wywołanej przez peptydy A $\beta$  następuje zaburzenie homeostazy wapnia i takich

metali, jak: miedź, cynk, żelazo. Poza skupiskami amyloidu w mózgu ważną rolę odgrywają NFT, będące wynikiem gromadzenia się w komórkach nerwowych patologicznych białek. Śródneuronalne NFT składają się w znacznej części z podwójnych ślimakowo skręconych filamentów (PHF – *paired helical filaments*), których głównym elementem jest białko tau w stanie hiperfosforylacji. Białko tau jest składnikiem prawidłowego cytoszkieletu neuronalnego. Znajduje się w aksonach mózgu, gdzie wiąże się z mikrotubulami, zapewniając ich wiązanie i stabilizację. PHF tworzą ścisłą sieć filamentów NFT. W ch. A. występują nieprawidłowości w licznych układach neurotransmisji: cholinergicznym, serotoninoergicznym, noradrenoergicznym i dopaminergicznym. Mózg jest miejscem przemian cholesterolu, lipidów i lipoprotein, jak również ekspresji mRNA apolipoproteiny E (ApoE), która bierze udział w regulacji funkcji neuronów w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym oraz homeostazy cholesterolu. ApoE znajduje się głównie pozakomórkowo w NFT [1–4].

Rozpoznanie choroby Alzheimera opierało się początkowo na pośmiertnych badaniach patomorfologicznych, również obecnie badania kliniczne oraz prace nad patomechanizmem neurodegeneracji należą do dominujących kierunków neurobiologii. Mimo postępu nauk medycznych, rozpoznanie następuje najczęściej zbyt późno, zwykle w drugiej lub nawet w trzeciej fazie rozwoju procesu chorobowego. Choroba pozostaje w stadium przedklinicznym przez wiele lat i postępując stopniowo doprowadza do dysfunkcji o.u.n.. Pierwotne usytuowanie zmian odnotowuje się w układzie limbicznym. Kliniczne rozpoznanie w przypadkach średniego i znacznego zaawansowania ch. A. jest skorelowane ze zmianami neuropatologicznymi, nie ma natomiast potwierdzonych możliwości rozpoznania we wczesnym okresie jej rozwoju, wtedy gdy interwencje lecznicze mogą okazać się najbardziej efektywne, co ostatecznie przełożyłoby się na polepszenie jakości życia pacjenta, zmniejszenie ciężaru opieki dla rodziny (służby zdrowia) oraz kosztów społecznych.

Ch. A. jest schorzeniem heterogennym pod względem zarówno klinicznym, jak i neuropatologicznym, biochemicznym i molekularnym. Dotychczas nie udało się określić w pełni wiarygodnego swoistego markera lub opracować testu pozwalającego na rozpoznanie ch. A. w stadium bezobjawowym oraz różnicowanie jej z objawami fizjologicznego starzenia.

Idealny biomarker klinicznie użyteczny powinien wykrywać zasadniczą neuropatologię leżącą u podłoża choroby, istniejącą już chorobę w okresie klinicznie bezobjawowym, a nie tylko zwią-

zone ryzyko zachorowania, rejestrować dynamikę choroby i skuteczność jej leczenia u konkretnego pacjenta, wykazywać czułość wyższą niż 85%, być specyficzny co najmniej w 75–85% w różnicowaniu ch. A. od innych chorób neurodegeneracyjnych. Pobranie materiału do określania markerów powinno być nieinwazyjne i łatwo dostępne oraz tanie i nieskomplikowane w wykonaniu. Musi obrazować nie tylko zmiany stężenia lub aktywności związków obecnych również u zdrowych ludzi, ale zwłaszcza takich, które pojawiają się tylko u chorych. Marker taki powinien być potwierdzony przez co najmniej dwa niezależne badania prowadzone przez kwalifikowane zespoły, a wyniki opublikowane w recenzowanych czasopismach. Dotychczas żaden z używanych markerów nie został w powyższy sposób zbadany jako istotny wskaźnik kliniczny, mogący mieć zastosowanie do pomiaru wczesnych procesów degeneracyjnych w mózgu. Postawienie właściwego rozpoznania jest często poprzedzone niespecyficznymi objawami fazy prodromalnej choroby, trwającej wiele lat, co jest dodatkową komplikacją [2, 5, 6].

Kliniczne rozpoznanie ch. A. jest określone dokładnym międzynarodowym protokołem i składa się z wielu elementów oceny: epidemiologicznej, neuropsychologicznej, elektroencefalograficznej oraz neuroobrazowania. Do tego dochodzą nieliczne markery biochemiczne i genetyczne, np. geny na chromosomie 14 i 1, kodujące APP i preseniliny, gen kodujący apoE. Nadzieje badaczy budzą nowe techniki neuroobrazowania, np. jądrowy rezonans magnetyczny (RM), fotonowa tomografia emisyjna, tzw. SPECT (oceniający przepływ krwi przez naczynia mózgowe), pozytonowa tomografia emisyjna (PET) oraz perfuzyjna tomografia komputerowa (pCT), pozwalająca na różnicowanie ch. A. i otępienia naczyniowego oraz mieszanego [7]. Metody neurofizjologiczne są dość tanie i użyteczne w rozpoznawaniu zaburzeń mózgu oraz do diagnostyki różnicowej, pozwalającej na określenie stopnia i topografii zwyrodnień neuronalnych, a tym samym na wykluczenie obecności guza lub przewlekłego krwaka i otępienia naczyniopochodnego.

Obserwowano duże zmiany w objętości białej i szarej istoty mózgu mierzone RM, które były istotnie związane z depresją występującą u ludzi w podeszłym wieku. Za pomocą dyfuzji RM badano wynikające z wieku uszkodzenia mózgu. Jako modelu ch. A. użyto transgenicznych myszy, wykazujących akumulację blaszek amyloidowych w wieku 8, 12, 16 i 18 miesięcy. Pozwoliło to na obserwację dyfuzji wody do białej i szarej istoty mózgu, co może wskazywać na degenerację aksonów i mieliny w podeszłym wieku [8, 9].

Bardzo czułym badaniem jest PET, w którym na podstawie analizy zaburzeń w metabolizmie glukozy i nadmiernej glikacji białek próbuje się postawić rozpoznanie ch. A. jeszcze przed wystąpieniem zmian zanikowych, szczególnie w obszarze skroniowo-ciemieniowym. Używa się do tego celu znakowane radioaktywnie pochodne fluoro-dezoksyglukozy, fluoro-6-dialkiloamino-2-naftyloetylidenu, tioflawiny i IBOX{-2-(4-dietyloaminofenilo)-6-jodobenzoaksazolu [10–12]. Technika protonowego rezonansu (0,5 tesla) stwierdzono w mózgach pacjentów zmniejszone poziomy glutaminianów i glutaminy (GLX) oraz N-acetyloaspariginianu (NAA), a zwiększone mioinozytolu. Czułość połączonych oznaczeń NAA i mioinozytolu w prawidłowej diagnostyce ch. A. sięgała 78% (dokładność 80%), a dodanie GLX podwyższało ją do 89% (dokładność 83%) [13]. Pomiar przepływu krwi w regionach naczyń mózgowych wykonane PET za pomocą technetu-99m okazały się czułe jako wczesne markery konwersji łagodnego zaburzenia poznawczego (MCI – *mild cognitive impairment*) do ch. A., a nawet pozwoliły na przewidywanie tego przejścia [14]. Kombinacja oznaczeń w płynie mózgowo-rdzeniowym białka tau z [<sup>123</sup>I] jodoamfetaminą (SPECT) wykazała czułość 88,5% i specyficzność 90% w różnicowaniu między MCI a ch. A. [15]. Pomiar atrofii, uzyskane za pomocą RM, w swoistych obszarach mózgu, takich jak hipokamp, wykrywają dość wcześnie rozwój otępienia i objawy zapowiadające wystąpienie ch. A.

SPECT pozwala rozpoznać proces zwyrodnieniowy przed wystąpieniem widocznych zmian strukturalnych (zaniku) w obrębie układu limbicznego. Jest także jedynym badaniem laboratoryjnym, pozwalającym podejrzewać otępienie niealzheimerowskie, szczególnie w początkowej fazie, ponieważ ujawnia rozmiar przepływu krwi w obszarze skroniowo-ciemieniowym. Zaburzenia w perfuzji kory mózgowej w badaniach SPECT są skorelowane z natężeniem procesu zwyrodnienia.

Do obrazowania niedużych depozytów  $\beta$ -amyloidowych w mózgu pacjentów z ch. A. zastosowano cztery pochodne 2-(4-aminofenilo)benzotiazolu, znakowane jodem-125 (BTA). Badania współzależności struktury i aktywności wykazały, że wiązanie pochodnych BTA w mózgu było skorelowane z objętością próbki i momentem dipolowym (D-p) [16].

Najważniejszym źródłem białek mózgu pojawiających się w płynach biologicznych jest płyn mózgowo-rdzeniowy (p.m.r.). Wiele białek w p.m.r. pochodzi z neuronów (enolaza neuronowa, kwaśne białko 14-3-3, białko tau), z astrocytów (S-100B, kwaśne białko gleju), z mikrogleju (ferytyna), z komórek stanu zapalnego (oligoklonalne IgG), oligodendrocytów (zasadowe białko mieliny).

Stężenie peptydów A $\beta$ 42/43 w p.m.r. może być wskaźnikiem rozwoju ch. A. Ich obniżony poziom (prawdopodobnie z powodu związania z blaszkami starczymi w korze) i stosunek A $\beta$ 42/43 w p.m.r. są uważane za marker diagnostyczny choroby.

Do ważnych biomarkerów ch. A. należy białko tau całkowite (T-tau) i fosforylowane (P-tau). Fosforylowane epitopy tau to: treoniny 181, 231, 235 i seryny 199, 396, 404. Pomiar P-tau ma znaczenie kliniczne, gdyż może być uważany za wskaźnik różnicowania ch. A. ze starzeniem fizjologicznym i niektórymi chorobami neurologicznymi. Kombinacja oznaczeń stężenia tau w p.m.r. z testem Krótkiej Skali Oceny Stanu Psychicznego (MMSE – *mini mental state examination*) wykazała 92% czułość i 87% specyficzność [17]. Stężenia T-tau i P-tau są podwyższone u pacjentów z ch. A., zwłaszcza w porównaniu z otępieniem naczyniopochodnym. Stężenia T-tau, P-tau181 i A $\beta$ 42 (marker metabolizmu peptydów i prawdopodobnie tworzenia blaszek starczych) w p.m.r. są podwyższone (białka tau) lub małe (peptyd) jeszcze przed objawami klinicznymi otępienia i są ważnym wskaźnikiem w identyfikacji pacjentów z MCI, u których rozwinię się ch. A. [18–20].

Wszechstronna analiza biomarkerów z punktu widzenia ich aktywności i stężeń stosowanych w diagnostyce ch. A., otępieniach niealzheimerowskich i depresji została opublikowana ostatnio w czasopiśmie *Dement Geriatr Cogn Disord* [21]. Oprócz uważanego za podstawowy wskaźnik stopnia neurodegeneracji stosunek P-tau181/A $\beta$ 42, mierzono w p.m.r. białko monocytowe 1 (MCP-1 – *monocyte chemoattractant protein 1*), makrofagowe zapalne białko 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$  – *macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$* ), (TNF- $\alpha$  – *tumour necrosis factor*), transformujący czynnik wzrostu  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$  – *transforming growth factor  $\beta_1$* ), czynnik wzrostu nerwów (NGF – *nerve growth factor*), a także inne mózgowo-czynniki: neurotropowy, wątrobowy, glejowy komórkowy neurotropowy, naczyniowy endotelialny i -2 z fibroblastów. Cztery główne grupy obejmowały pacjentów z ch. A., z otępieniem czołowo-skroniowym, depresją i otępieniem alkoholowym. Częstość występowania allelu ApoE4 była istotnie wyższa u pacjentów z ch. A. niż w demencji i depresji. Główne markery (A $\beta$ 42, T-tau, P-tau181) wykazywały istotne powiązanie z ch. A. (nie z wiekiem). Analiza ROC (*receiver operating characteristic*) ujawniła znaczenie tych trzech markerów w różnicowaniu ch. A. i zdrowych ludzi (czułość 80%, specyficzność 73%), z innymi otępieniami (czułość 80%, specyficzność 97%) i z innymi schorzeniami neurologicznymi (czułość 80%, specyficzność 89%). Spośród cytokin i chemokin tylko poziom MCP-1 był

istotnie wyższy u pacjentów z ch. A. i w demencji alkoholowej w porównaniu z depresją i znacznie wzrastał w miarę starzenia, lecz nie pozwalał na rozróżnienie ch. A. od zdrowych. Poziom NGF był ponadto istotnie wyższy w ch. A. w porównaniu ze zdrowymi, co prawdopodobnie jest wynikiem dynamiki procesu neurodegeneracyjnego typu ch. A. [22].

Kwaśne białko włóknikowe (GFAP – *glial fibrillary acidic protein*) i przeciwciała w p.m.r. mogą być markerem znacznej, późnej neurodegeneracji, podczas gdy 2 4S-OH-cholesterol – wcześniej. Podwyższone stężenie GFAP w p.m.r. w ch. A. jest skorelowane ze stopniem otępienia, niezależnie od wieku [23]. Stężenie  $\alpha_1$ -antychymotrypsyny w surowicy jest odpowiednim markerem do określenia stanu zapalnego ośrodkowego układu nerwowego [23].

Interesującym biomarkerem jest 8-hydroksy-2-dezoksyguanozyna (8-OhdG), która jest produktem ataku rodników tlenowych na DNA. Stosunek wolnej 8-OhdG (wydalanej w moczu) do związanej z DNA, oznaczanej w p.m.r. mózgu podczas autopsji, był 108 razy wyższy u pacjentów z ch. A. w porównaniu ze zdrowymi osobami. Jest to bardzo rzadko spotykany marker, oznaczany w moczu, spełniający zatem postulaty nieinwazyjności i łatwości wykonania [24].

Zwiększenie glikacji, oksydacji i nitrowania w niszczeniu białek bierze udział w śmierci neuronów, prowadzącej do ch. A. Powstają addukty, których oznaczanie w p.m.r. może być wskaźnikiem biochemicznym użytecznym w diagnozie ch. A. U pacjentów z ch. A. w białkach p.m.r. stwierdzono wzrost stężenia 3-nitrotyrozyny, N-karboksymetylolizyny, hydroimidazolonu (pochodzącego z 3-dezoksyglukozy) i N-formylokinureniny. Test MMSE był ujemnie skorelowany ze stężeniem 3-nitrotyrozyny. Analiza regresji liniowej z modelem MMSE wskazała na 3-nitrotyrozinę ( $p = 0,021$ ), fruktozylolizynę ( $p = 0,052$ ). Jest to od niedawna stosowany nowy marker biochemiczny funkcji poznawczych w ch. A. Addukty nitracji, oksydacji i glikacji w p.m.r. mogą więc być wartościowymi klinicznymi wskaźnikami w diagnostyce ch. A. [25, 26].

W nowoczesnym laboratorium badania zwykle przeprowadza się za pomocą testu ELISA z przeciwciałami skierowanymi m.in. przeciw peptydom A $\beta$ (1-42) lub dwuwymiarową elektroforezą, która pozwoliła na identyfikację 40 różnych białek w p.m.r., w tym wielu glikoprotein [27]. W 2005 roku do cytometrii przepływowej zastosowano nową technologię (xMAP<sup>TM</sup>), w której następuje wychwytywanie przeciwciała przez swoiste spektralnie mikrosfery (kapsułki o średnicy 0,5–2 mm), znakowane w tym przypadku dwoma fluorochromami (czerwonym i pomarańczowym) o określo-

nym stężeniu. Do oznaczeń dodaje się drugie przeciwciała i trzeci fluorochrom (żółty). Ta technologia zajmuje obszar pośredni, między pomiarami pojedynczego białka (ELISA) a pomiarami licznych białek/peptydów (spektrometria masowa/proteomika) [28].

Określenie proteomiki odnosi się do analizy na dużą skalę równocześnie wielu białek kodowanych przez genom w specyficznej tkance i warunkach oraz w określonym czasie. Jeśli przyszłe badania oparte na proteomice będą mogły zidentyfikować pochodzący z p.m.r. zestaw istotnych diagnostycznie biomarkerów, które zostaną zaadaptowane do technologii xMAP, to diagnostyka chorób neurodegeneracyjnych zdobędzie świetny oręż do walki z ch. A.

Rozwój i funkcje układu nerwowego zależą ściśle od produktów ekspresji genów i ich interakcji. Minimalne nawet zmiany ekspresji genów w odnośnych regionach mózgu mogą wywołać poważne konsekwencje w aktywności całego układu. Np. małe zmiany w produktach ekspresji genów regulatorowych prowadzą do wzrostu podatności gospodarza na rozwój chorób układu nerwowego (autyzm, schizofrenia, depresja, a również choroba Parkinsona i Alzheimera). Współczesne techniki genomiczne i proteomiczne pozwalają na badanie ekspresji wielu genów równocześnie. Jest to o tyle ważne, że ogromną trudność w badaniach układu nerwowego powoduje wielka różnorodność typów komórek, innych niż w pozostałych tkankach. Uważa się, że ponad połowa wszystkich białek ludzkiego organizmu wykazuje ekspresję w mózgu, ekspresja genów i białek ponadto nie jest statyczna (uczenie się i adaptacja), wiele produktów genów (np. receptory neurotransporterów) są produkowane w bardzo małych ilościach w porównaniu z białkami strukturalnymi.

Płytki komplementarnego DNA (cDNA) są technologią, która może być stosowana do badań interakcji między ekspresją genów a mikrootoczeniem. Są to bardzo gęste sekwencje oligonukleotydów lub cDNA związane ze strukturalną podstawą. Ze znakowanych cząsteczek kwasów nukleinowych izolowanych z tkanki tworzy się hybrydy z dużą liczbą unieruchomionych cząsteczek DNA zestawionych w specyficznych położeniach na stałej podstawie. Jedną z głównych cech tej metody dotyczy wykrywania polimorfizmu i genotypowania (genomika). Z tkanki pobranej pośmiertnie można dokonać ekstrakcji RNA, który jest odwrotnie transkrybowany do cDNA. Izolowany cDNA jest znakowany fluorochromami i hybrydowany z pojedynczym zestawem cDNA lub sekwencjami oligonukleotydowymi. Porównanie intensywności sygnału poszczególnego fluoru stosuje się do oznaczenia różnicowej ekspresji każdego

transkryptu genowego. Tego typu badania przeprowadzono na neuronach hipokampu z ch. A. Otrzymano spadek ekspresji mRNA kodującego czynniki neurotropowe i sygnałowe biorące udział w plastyczności synaps i metabolizmie jonów metali takich białek, jak: synaptofizyna, metalotioneina III, regulator metali czynnik-1. Stwierdzono również zwiększoną ekspresję genów biorących udział w sygnałach stanu zapalnego i apoptozie: APP, IL-1, NFκ.

Inny obszar mózgu związany z neuropatologią ch. A. to przodomózgowie ze względu na obecność w jądrze podstawnym neuronów cholinergicznym. Badania w okresie wczesnych zmian funkcji poznawczych w przebiegu MCI mogą pomóc w identyfikacji istotnych czynników odpowiedzialnych za funkcje poznawcze, a model ich deterioracji ułatwia różnicowanie z naturalnym procesem starzenia. Są to geny związane z receptorami NMDA oraz podjednostka acetylocholinesterazy, enzymy mitochondrialne, regulatory fosforylacji i układ zależny od wapnia [29].

Zastosowanie proteomiki do identyfikacji markerów w otępieniu czołowo-skroniowym pozwoliło na znalezienie wielu zmienionych patologicznie białek, m.in. graninopodobnego prekursora neuroendokrynnego, czynnika pigmentowego z naskórka, białka wiążącego retinol, apoE, haptoglobiny i albuminy [30]. W czasie analizy różnych regionów mózgu wykazano ekspresję setki różnych zmienionych patologicznie białek. Proteomika i genomika pomogą w niedalekiej przyszłości w wykryciu potencjalnych celów dla leków ukierunkowanych na takie choroby, jak m.in. ch. A. czy schizofrenia.

Małe rozpuszczalne oligomery peptydów odnoszące się do pochodzących z  $\beta$ -amyloidów rozpuszczalnych ligandów (ADDL – *amyloid- $\beta$ -derived diffusible ligands*) są uważane za przyczynę utraty pamięci w ch. A., czego dowodem było m.in. przywrócenie jej u myszy po zastrzyku przeciwciał anty $\beta$ -amyloidowych. Korelacja poziomów ADDL w p.m.r. z obrazem klinicznym choroby pozwala na polepszenie diagnozy i wczesne zastosowanie leczenia. Udało się osiągnąć przez związanie specyficznych przeciwciał monoklonalnych anty-ADDL z ultraczułą, opartą na nanocząsteczkach strategią oznaczania białka, zwaną amplifikacją *barcode*. Ultraczułe metody oznaczania kwasów nukleinowych są już obecnie stosowane, białka natomiast nie mogą być bezpośrednio kopiowane, lecz trzeba użyć procesu immunoprecypitacji, w którym czułość jest większa w porównaniu z testem ELISA. Potrzebne jest tu połączenie z drugorzędowymi przeciwciałami anty-DNA oraz termocyklizacja i enzymatyczna amplifikacja. Daje to 1000-krotny wzrost czułości w porów-

naniu z tradycyjną ELISA, a *barcode* nawet milionowy. W tego typu doświadczeniu do p.m.r. dodaje się monoklonalne przeciwciała anty-ADDL, związane z magnetycznymi nanocząsteczkami złota, które następnie są oddzielone polem magnetycznym i wmyte przed dodaniem koniugatów drugorzędowych przeciwciał związanych z DNA. Niezwiązane koniugaty są usuwane magnetycznie, następnie wysoka temperatura i małe stężenie soli zwalniają *barcode* DNA do analizy. Selektywnie zebrane nanosfery Au mogą działać jako miejsca nukleacji dla złogów srebra po redukcji  $Ag^+$  z roztworu. Depozyty Ag mogą być bezpośrednio skanowane. Pozwoliło to na uzyskanie czułości atomolarniej ( $30 \times 10^{-18}$  M) w oznaczeniach specyficznego antygeny prostaty. Zastosowanie *barcode* do korelacji ADDL w p.m.r. ze stanem klinicznym ch. A. jest jednym z prawdziwych realnych zastosowań nanotechnologii (manipulacja na poziomie atomów i cząsteczek), a perspektywa wczesnej diagnozy jest szczególnie istotna, uwzględniając korzystny wpływ przeciwciał anty-ADDL na poprawę pamięci u myszy [8, 30]. Możliwościami oznaczeń ilościowych w analizie składu metabolicznego płynów i tkanek ciała zajmuje się nowa nauka – metabolomika, która zapewne znajdzie zastosowanie nie tylko w biologii molekularnej, lecz również, co bardzo ważne, w farmakologii.

Mimo niewątpliwych osiągnięć współczesnej diagnostyki klinicznej i laboratoryjnej chorób neurodegeneracyjnych (proteomika, genomika, metabolomika), przegląd piśmiennictwa z ostatnich trzech lat wskazuje, że tylko nieliczne metody i oznaczenia nadają się do rutynowej diagnostyki z powodu bardzo drogiej aparatury, skomplikowanego wykonania, niedostatecznej swoistości lub wysokich kosztów dostępnych w kraju testów. Należy się zgodzić z powszechną opinią, że dotychczas nie ma jednego markera diagnostycznego, pozwalającego na różnicowanie ch. A. zarówno z innymi otępieniami, jak również z objawami naturalnego procesu starzenia.

W dalszym ciągu nie ma kluczowych eksperymentów wykazujących związki funkcjonalne między zaburzeniami molekularnymi a objawami klinicznymi (fenotypami). Ch. A. nie jest wynikiem jednego specyficznego uszkodzenia, lecz następstw skomplikowanej kaskady zaburzonych procesów biologicznych w układach neuro-nieneurologicznych (np. naczyniowych, immunologicznych, endokrynologicznych i metabolicznych) w powiązaniu z heterogennością fenotypów. Już w 2002 roku Khachaturian [6] postawił wiele pytań, na które do dzisiaj nie ma odpowiedzi: jak te kaskadowe reakcje prowadzą do dysfunkcji komórki i/lub śmierci, dlaczego i jak ekspresja tych zaburzonych procesów uwidacznia się dopiero

w późnych latach życia, dlaczego działa tylko na pewne typy komórek w pewnych częściach mózgu, a nie w innych, jak czynniki ryzyka, takie jak: wiek, wykształcenie, uraz głowy i toksyny współdziałają z predyspozycją genetyczną? Dalszymi problemami są relacje między neurobiologią a klinicznymi fenotypami choroby oraz brak właściwego modelu dla badań nad współzależnością między zmianami biochemicznymi/molekularnymi a objawami klinicznymi.

Należy mieć nadzieję, że postępy medycyny, biologii molekularnej i biotechnologii doprowadzą w niedalekiej przyszłości nie tylko do wprowadzenia nowych, działających przyczynowo, leków na choroby neurodegeneracyjne, stosowanych również profilaktycznie (szczepionki?), ale również doprowadzą do znacznych sukcesów w dziedzinie wczesnej diagnostyki, pozwalających i umożliwiających wypracowanie nowych strategii terapeutycznych.

## Piśmiennictwo

- [1] **Kril JJ:** Alzheimer's disease: its diagnosis and pathogenesis. *Intern Rev Neurobiol* 2001, 48, 167–217.
- [2] **Verhey FRJ:** Old and forgotten: Alzheimer's lessons. *Arch Gerontol Geriatr* 2004, Suppl. 9, 455–464.
- [3] **Dobryszczycka W:** Metaboliczne podstawy choroby Alzheimera. W: *Demencje Wiekii podeszłego*. Wyd Continuo, Wrocław 2004, 9–66.
- [4] **Dobryszczycka W, Leszek J:** Rola metali w patomechanizmie choroby Alzheimera (miedź, cynk, żelazo). *Psychoger Pol* 2005, 2, 117–124.
- [5] **Bilikiewicz A:** Aktualna sytuacja psychogeriatry w Polsce. *Psychoger Pol* 2004, 1, 1–5.
- [6] **Khachaturian ZS:** The challenges of developing and validating molecular and biochemical markers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2002, 23, 509–511.
- [7] **Zimny A, Sasiadek M, Leszek J, Czarnecka A, Trypka E, Kiejna A:** Does perfusion CT enable differentiating Alzheimer's disease from vascular dementia and mixed dementia? – preliminary report. *J Neurol Sci* 2006 (in press).
- [8] **Taylor WD, MacFall JR, Payne ME, McQuoid DR, Steffens DC, Provenzale JM, Krishnan RR:** Greater MRI lesion volumes in elderly depressed subjects than in control subjects. *Psychiatry Res-Neuroimag* 2005, 139, 1–7.
- [9] **Sun SW, Song NK, Harms MP, Lin SJ, Holtzman DM, Merchant KM, Kotyk JJ:** Detection of age-dependent brain injury in a mouse model of brain amyloidosis associated with Alzheimer's disease using magnetic resonance diffusion tensor imaging. *Exp Neurol* 2005, 191, 77–85.
- [10] **Foster NL:** Validating FDG-PET as a biomarker for frontotemporal dementia. *Exp Neurol* 2003, 184, S2–S3.
- [11] **Agdeppa ED, Kepe V, Liu J, Flores-Torres S, Satyamurthy N, Petric A, Cole GM, Small GW, Huang S-C, Barrio JR:** Binding characteristics of radiofluorinated 6-dialkylamino-2-naphthylethylidene derivatives as positron emission tomography imaging probes for  $\beta$ -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2001, 21: RC189 (1–5).
- [12] **Zhuang Z-P, Kung M-P, Hou C, Plossl K, Skovronsky D, Gur TL, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, Kung HF:** IBOX(2-{4'-dimethylaminophenyl}-6-iodobenzoxazole): a ligand for imaging amyloid plaques in the brain. *Nucl Med Biol* 2001, 28, 887–894.
- [13] **Antuono PG, Jones JL, Wang Y, Li S-J:** Decreased glutamate plus glutamine in Alzheimer's disease detected *in vivo* with  $^1\text{H-MRS}$  at 0.5 T. *Neurol* 2001, 56, 737–742.
- [14] **Encinas M, de Juan R, Marcos A, Gil P, Barabash A, Fernandez C, de Ugarte C, Cabranes JA:** Regional cerebral blood flow assessed with  $^{99\text{m}}\text{Tc-ECD}$  SPECT as a marker of progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003, 30, 1473–1480.
- [15] **Okamura N, Arai H, Maruyama M, Higuchi M, Matsui T, Tanji H, Seki T, Hirai H, Chiba H, Itoh M, Sasaki H:** Combined analysis of CSF tau levels and  $^{123}\text{I}$  iodoamphetamine SPECT in mild cognitive impairment: implication for a novel predictor of Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 2002, 159, 474–476.
- [16] **Wang WS, Zhang JM, Lin BL:** QSAR study of 1-125-labeled 2-(4-aminophenyl)benzotiazole derivatives as imaging agents for  $\beta$ -amyloid in the brain with Alzheimer's disease. *J Radioanal Nucl Chem* 2005, 266, 107–111.
- [17] **Ganzer S, Arlt S, Schoder V, Buhmann C, Mandelkow E-M, Finckh U, Beisigiel U, Naber D, Muller-Thompson T:** CSF-tau, CSF-A $\beta$ 1-42, ApoE genotype and clinical parameters in the diagnosis of Alzheimer's disease: combination of CSF-tau and MMSE yields highest sensitivity and specificity. *J Neural Transm* 2003, 110, 1149–1160.
- [18] **Andreasen N, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Blennow K:** Cerebrospinal fluid levels of total-tau, phospho-tau and A $\beta$ 42 predicts development of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Acta Neurol Scand* 2003, 107, 47–51.
- [19] **Sjogren M, Andreasen N, Blennow K:** Advances in the detection of Alzheimer's disease – use of cerebrospinal fluid biomarkers. *Clin Chim Acta* 2003, 332, 1–10.
- [20] **Sobów T, Flirski M, Liberski PP:** Amyloid-beta and tau proteins as biochemical markers of Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp* 2004, 64, 53–70.
- [21] **Blasko I, Lederer W, Oberbauer H, Walch T, Kemmler G, Hinterhuber H, Marksteiner J, Humpel C:** Measurement of thirteen biological markers in CSF of patients with Alzheimer's disease and other dementias. *Dementia Geriatr Cognit Disord* 2005, 24.

- [22] **Teunissen CE, de Vente J, Steinbusch HWM, De Bruijn C:** Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid. *Neurobiol Aging* 2002, 23, 485–508.
- [23] **Lovell MA, Markesbery WR:** Ratio of 8-hydroksyguanine in intact DNA to free 8-hydroksyguanine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease ventricular cerebrospinal fluid. *Arch Neurol* 2001, 58, 392–396.
- [24] **Ahmed N, Ahmed U, Thornalley PJ, Hager K, Fleischer G, Munch G:** Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *J Neurochem* 2004, 10, 1471–4159.
- [25] **Puchades M, Folkesson Hansson M, Nilsson CL, Andreasen N, Blennow K, Davidsson P:** Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease. *Molec Brain Res* 2003, 118, 140–146.
- [26] **Staniszewska M, Leszek J, Małyszczak K, Gamian A:** Are advanced glycation end-products specific biomarkers for Alzheimer's disease? *Int J Geriatr Psychiatry* 2005, 20, 896–897.
- [27] **Miller BB, Mandell JW:** Multiplex method for measuring biomarkers of Alzheimer disease. *Clin Chem* 2005, 51, 289–290.
- [28] **Marcotte ER, Srivastava LK, Quirion R:** cDNA microarray and proteomic approaches in the study of brain diseases: focus on schizophrenia and Alzheimer's disease. *Pharmacol Therapeut* 2003, 100, 63–74.
- [29] **Davidsson P, Sjogren M, Andreasen N, Lindbjær M, Nilsson CL, Westman-Brinkmalm A, Blennow K:** Studies of the pathophysiological mechanisms in frontotemporal dementia by proteome analysis of CSF proteins. *Brain Res Mol Brain Res* 2002 109, 128–133.
- [30] **Keating CD:** Nanoscience enables ultrasensitive detection of Alzheimer's biomarker. *PNAS* 2005, 102, 2263–2264.

### Adres do korespondencji:

Wanda Dobryczycka  
Chair and Department of Pharmacological Biochemistry  
Silesian Piasts University of Medicine  
ul. Szewska 38/39  
50-139 Wrocław  
Poland

Conflict of interest: None declared

Praca wpłynęła do Redakcji: 28.02.2006 r.  
Po recenzji: 21.09.2006 r.  
Zaakceptowano do druku: 21.09.2006 r.

Received: 28.02.2006  
Revised: 21.09.2006  
Accepted: 21.09.2006