

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vyšetření markerů neurodegenerace u
Alzheimerovy choroby**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Zlata Šťastná
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lucie Roubalová
Termín odevzdání práce:	2. května 2013

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s využitím níže uvedené literatury.

Zlata Šťastná

Děkuji Mgr. Lucii Roubalové za pomoc s vypracováním diplomové práce a odborné vedení. Všem členům oddělení klinické biochemie také děkuji za jejich pomoc a vstřícnost. Děkuji své rodině za podporu v průběhu celého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc.Zlata Šťastná
Název práce	Vyšetření markerů neurodegenerace u Alzheimerovy choroby
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení klinické biochemie, FN Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Roubalová
Rok obhajoby práce	2013

Abstrakt

Alzheimerova choroba je nevléčitelná, neurodegenerativní nemoc, mající za následek ztrátu paměti, změny chování a postupný vývoj demence. V patologickém procesu Alzheimerovy choroby extracelulární depozita beta amyloidu (amyloidní plaky) a intraneuronální akumulace hyperfosforylovaného tau proteinu (neuronální klubka) hrají hlavní roli. Tento triplet, beta amyloid, tau protein a jeho hyperfosforylovaná forma phospho - tau protein, jsou velmi důležité biomarkery detekce Alzheimerovy choroby. Cílem této práce bylo zavést tyto tři biomarkery do rutinní laboratorní praxe. Solid-phase enzymová imunoanalýza byla využita k detekci biomarkerů v likvoru pacientů. Stanovení těchto markerů přispívá k časně diagnóze Alzheimerovy choroby. Tímto přispívá ke zpomalení průběhu onemocnění a určité prognóze do budoucna. Dalšími cíly práce byla verifikace metody, vyhodnocení nejčastější příčiny onemocnění a vytvoření diskuse ve srovnání s dostupnou literaturou.

Klíčová slova	Alzheimerova choroba, beta - amyloid, tau protein, phospho - tau protein.
Počet stran	79
Počet příloh	
Jazyk	český

Bibliographic identification:

Autor's first name and surname	Bc.Zlata Šťastná
Title	Examination markers of neurodegeneration in Alzheimer's disease
Type of thesis	master
Department	Department of clinical biochemistry, UH Olomouc
Supervisor	Mgr. Lucie Roubalová
The year of presentation	2013

Abstrakt

Alzheimer's disease is incurable, neurodegeneration disease, resulting in loss of memory, mood and behaviour changes. In the pathological process of Alzheimer's disease extracellular deposits of amyloid-beta peptides (forming senile plaques) and intraneuronal accumulation of hyperphosphorylated tau protein (neurofibrillary tangles) play a major role. These triplet, amyloid-beta, tau protein and hyperphosphorylated form of the tau protein phospho-tau protein, are very important biomarkers of the detection of Alzheimer's disease. The aim of this thesis was to put these three biomarkers into the routine laboratory practice. Solid-phase enzyme immunoassay was used to detect biomarkers in patient cerebrospinal fluid. Determination of these markers contribute to early diagnosis of Alzheimer's disease. Thereby it contributes to slowdown the disease and reflects a prognosis for the future. Other aims of the thesis were to provide verification of these methods, evaluate the most common causes of disease and create the discussion in comparison with the available literature.

Keywords	Alzheimer's disease, beta-amyloid, tau protein, phospho-tau protein.
----------	--

Number of pages	79
-----------------	----

Number of appendices	
----------------------	--

Language	czech
----------	-------

Obsah

1 CÍLE PRÁCE	- 8 -
2 TEORETICKÁ ČÁST	- 9 -
2.1 Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease – AD).....	- 9 -
2.1.1 Obecná charakteristika nemoci	- 9 -
2.1.2 Historie Alzheimerovy choroby.....	- 9 -
2.1.3 První příznaky	- 10 -
2.1.4 Charakteristika patologie onemocnění.....	- 10 -
2.1.4.1 Amyloidový prekurzorový protein (APP)	- 13 -
2.1.4.2 Amyloid beta (A β)	- 14 -
2.1.4.4 PHOSPHO-TAU protein (p-tau).....	- 15 -
2.1.5 Rizikové faktory.....	- 16 -
2.1.6 Stádia nemoci.....	- 18 -
2.1.7 Diagnostika	- 19 -
2.1.7.1 Hlavní diagnostická kritéria NINCDS-ADRDA:	- 19 -
2.1.7.2 Vyšetření pacienta.....	- 20 -
2.1.7.3 Vyšetření mozkomíšního moku – biomarkery AD : ↓ beta amyloid, ↑ tau protein, ↑ p - tau	- 20 -
2.1.8 Terapie	- 21 -
3 PRAKTICKÁ ČÁST	- 22 -
3.1 Biologický materiál.....	- 22 -
3.1.1 Likvor (mozkomíšní mok-cerebrospinal fluid-CSF)	- 22 -
3.1.2 Odběr, skladování a transport CSF	- 22 -
3.1.3 Výběr skupiny pacientů	- 22 -
3.2 Chemikálie	- 24 -
3.3 Přístroje	- 28 -
3.4 Metodika - ELISA.....	- 28 -
3.4.1 hTAU protein - princip	- 28 -
3.4.2 PHOSPHO - TAU protein - princip	- 29 -
3.4.3 β - AMYLOID ₍₁₋₄₂₎ - princip	- 29 -
3.5 Postup.....	- 30 -
3.5.1 Tau-protein.....	- 32 -
3.5.2 Phospho - tau protein	- 33 -
3.5.3 β - Amyloid	- 34 -
3.6 Verifikace metody	- 36 -

4 VÝSLEDKY	- 37 -
4.1 Verifikace.....	- 37 -
4.2 Výsledky pacientů	- 38 -
4.2.1 Vyhodnocovací kritéria.....	- 38 -
4.2.2 Vyhodnocení tripletu markerů pro detekci Alzheimerovy choroby	- 53 -
4.3 Vyhodnocení rizikových faktorů u pozitivních pacientů	- 59 -
5 DISKUSE	- 62 -
6 ZÁVĚR.....	- 70 -
7 LITERATURA	- 72 -
7.1 Seznam literatury.....	- 72 -
7.2 Seznam hypertextových odkazů	- 78 -
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	- 79 -

1 Cíle práce

1. Zavedení metody stanovení přítomnosti všech tří biomarkerů v mozkomíšním moku do rutinní laboratorní praxe. Vytvoření standardního operačního postupu vyšetření.
2. Ověření analytických znaků metody.
3. Na základě pozitivních výsledků detekovat nejčastější příčiny onemocnění.
4. Zhodnotit výsledky a porovnat s literaturou.

2 Teoretická část

2.1 Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease – AD)

2.1.1 Obecná charakteristika nemoci

AD je neurodegenerativní onemocnění, mající za následek zhoršení paměti, změny chování a postupný vývoj demence. (Yang Z. et al., 2012) Jedná se progresivní, chronickou a i přes neustálý výzkum stále neléčitelnou nemoc. (Sharma V. et al., 2012) Typický výskyt nemoci je nad 65 let. S prodlužováním průměrné délky života, zejména ve vyspělých státech světa, její prevalence výrazně narůstá. (Vališ M. et al., 2008) Epidemiologické studie ukazují, že AD je vedoucí příčina demencí, čítající celosvětově okolo 50% všech případů. (Dong S. et al., 2012) Nemoc se může vyvíjet 8 až 20 let, v závislosti na životních podmínkách a zdravotním stavu postiženého. (Callone P.R. et al., 2008) V současné době není jednoznačně určena příčina vzniku Alzheimerovy choroby, zřejmě se ale jedná o kombinaci změn souvisejících s věkem, genetických rizikových faktorů, prostředí a životního stylu. (Krishnan. K.J. et al., 2012) Z neuropatologických nálezů je znám průběh nemoci. Dostupná data svědčí o tom, že vznik Alzheimerovy choroby je multifaktoriální.

2.1.2 Historie Alzheimerovy choroby

Jako první toto onemocnění popsal Alois Alzheimer, to když v roce 1901 byla do nemocnice ve Frankfurtu nad Mohanem přijata se známkami demence paní Augusta D.. Alzheimer o ní referoval roku 1906 na 37. schůzi jihu německých psychiatrů a případ byl publikován roku 1907. Průkopnické výzkumy Aloise Alzheimerova se zaměřily na časnou formu této demence (familiární forma), která je vzácná, začíná ve středním věku a rychle postupuje. A to z toho důvodu, že se lidé dříve nedoživali tak vysokého věku, jak je tomu v současnosti, proto většina lidí zemřela dříve než by se u nich mohla projevit sporadická forma nemoci, která začíná v pozdním věku. (Koukolník F. & Jiráček R., 1998; Bragdon A.D. & Gamon D., 2002)

V Alzheimerově záznamu z roku 1907 je popisována přítomnost plaků a klubek u jednoho případu presenilní demence. Ve stejném roce Oskar Fischer našel neuritické plaky ve 12 - ti případech senilní demence. Alzheimer i Fischer shodně našli hlavní patologické znaky choroby a na základě jejich objevů došlo ke stanovení klinicko - patologických rysů nemoci dnes známé jako Alzheimerova choroba. Nemoc byla pojmenována jako Alzheimerova Emilem Kraepelinem, vedoucím Royal

Psychiatric Clinic v Mnichově, kde Alzheimer pracoval v letech 1903 až 1912. (Goedert M., 2009)

2.1.3 První příznaky

Rozpoznání počátků nemoci nemusí být snadné. Velmi často si postižený začínající problém nechce připustit. V tomto ohledu je velice důležité okolí nemocného, které si většinou všimne, že něco není v pořádku. Důležité je navštívit co nejdříve lékaře, který určí správnou diagnózu, aby byla započata včasná léčba.

- ✓ ztráta paměti (zejména krátkodobé; jde tedy spíše o poruchy učení a zapamatování si učeného)
- ✓ problémy s vykonáváním běžných každodenních aktivit
- ✓ poruchy jazykové funkce – zapomínání slov a problémy s vyjadřováním
- ✓ dezorientace – v čase i prostoru
- ✓ zhoršující se schopnost úsudku, stále obtížnější rozhodování – neschopnost racionálního uvažování
- ✓ potíže s abstraktním myšlením
- ✓ nesprávné umístování předmětů – neschopnost je pak najít
- ✓ problémy při oblékání
- ✓ změny osobnosti, nálady a chování
- ✓ ztráta zájmu o koníčky a zaměstnání
- ✓ snížená iniciativa (Bragdon A.D. & Gamon D., 2002; internet 1)

2.1.4 Charakteristika patologie onemocnění

Dosud není zcela jasná příčina, která spouští rozvoj Alzheimerovy choroby, ale dostupné nálezy a studie ukazují, že mezi obecné příčiny spojené s AD patří:

- genetika
- kardiovaskulární choroby
- autoimunitní porucha
- poranění hlavy
- obecně úroveň životního stylu (toto má mnoho faktorů od stresu až po špatnou životosprávu).
- prostředí

Příčina genetická – u familiární i sporadické formy AD.

- Sporadická forma - Příčina vzniku je stále neznámá, ovšem pravděpodobně zahrnuje, jak polygenetické tak enviromentální faktory. Zde je genetickým činitelem apolipoprotein E (ApoE) - je predominantním apolipoproteinem

v centrální nervové soustavě (CNS) a je syntetizován a sekretován hlavně astrocyty a mikroglie. ApoE má stěžejní roli v transportu lipidů mezi CNS buňkami, v udržení lipidové homeostázy, opravě poškození neuronů, udržení synaptických spojení a odklizení toxinů. ApoE $\epsilon 4$: hlavní gen pro sporadickou AD. Existují 3 různé isoformy lidského ApoE – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, kódované různými alelami (2,3,4). ApoE hraje hlavní roli v intracelulární β - amyloidní clearance mozku. Ovšem ApoE $\epsilon 4$ alela má negativní vliv na β - amyloidní clearance, toto přispívá k agregaci peptidových fragmentů a tím k tvorbě amyloidních plaků. Sporadická AD je asociována se snížením rychlosti β - amyloidní clearance z CNS. ApoE $\epsilon 4$ slouží také k transportu cholesterolu, který je jedním z možných rizikových faktorů vzniku nemoci. Osoba která má jednu kopii $\epsilon 4$ trpící traumatickým poškozením mozku má relativní riziko demence zvýšené minimálně 10krát. (Dong S. et al., 2012; VanItallie T.B., 2013; Tan Z.S. et al., 2003)

- Familiární forma (FAD): 5 – 10% všech případů tohoto onemocnění.
 - s časným začátkem – do 60.roku života
 - s pozdním začátkem – po 60. roce života (Koudelková M., 2010)

Tato forma zahrnuje více genetických činitelů a těmi jsou:

- Amyloidní prekurzorový protein (APP) – zde je příčinou AD mutace genu kódujícího tento protein. Tato mutace vede k sestřihu APP v β - místě pomocí β - sekretasy (EC 3.4.23.46), tento sestřih má za následek tvorbu depozit A β .
- Presenilin (PS) – existují dva PS geny (PS1, PS2). PS, nicastrin, aph - 1 a pen - 2 tvoří aktivní γ - sekretasový komplex, kde PS tvoří katalytické jádro komplexu. PS1 mutace je nejběžnější genetická příčina časného počátku familiární AD (FAD). PS geny kotví okolo 90% identifikovaných FAD mutací. Bylo popsáno více než 100 PS1 mutací. Některé z nich jsou asociovány s velmi časným počátkem (před 30 rokem života) poklesu. Mnoho PS1 mutací vede k nárůstu produkce více toxického A β 42 peptidu. Běžná amyloidní hypotéza předpokládá, že deposita A β peptidu, speciálně, více hydrofobní a agregace - náchylná A β 42 iniciuje patogenní kaskádu vedoucí k neurodegeneraci známé u AD. Toto je tedy toxický příspěvek funkce PS v iniciaci neurodegenerace AD. (Dong S. et al., 2012)
- Autoimunitní hypotéza – buňky imunitního systému útočí na neurony po poškození hematoencefalické bariéry (Blood Brain Barrier – BBB). BBB může být poškozena dvěma důležitými rizikovými faktory, které vedou k AD:

kardiovaskulární nemoci (ateroskleróza, hypertenze, úrazy, traumatické poškození mozku) a genetika, kde mutace APP genu vede k A β nadprodukcí mající za následek akumulaci nejen v mozku, ale i na stěnách mozkových krevních cév s následnou BBB poruchou. (Arshavsky Y.I., 2006)

- **zánět** – esenciální částí AD patogeneze je zánětlivý proces vyvolaný amyloidními depozity. Tento proces je charakterizován astrogliórou (abnormální zvýšení množství astrocytů způsobené destrukcí blízkých neuronů, následkem ischemie, traumatu, infekce nebo autoimunity), mikrogliórou (nahromadění mikroglíí v mozku jako odpověď na ischemii nebo infekci), zvýšením hladin cytokinů a změnami v akutní fázi proteinů. (Sharma V. et al., 2012; Arshavsky Y.I., 2006)
- Cytostukturální změny u AD jsou způsobeny třemi mechanismy, které vysvětlují podíl imunitního procesu ve vývoji symptomů nemoci. Těmi jsou:
 - a) abnormální autoimunitní reakce namířená vůči komponentám mozkové tkáně
 - b) lokální imunitní reakce způsobená poškozením mozkové tkáně; tyto normální imunitní reakce jsou lokálně zesíleny v mozkové tkáni, což vede k dalšímu strukturálnímu a funkčnímu poškození CNS
 - c) narušení imunocytokinové sekrece (nadměrná sekrece a ukládání INF- γ , TNF, IL-1, IL-2, IL-6 nalezené v okolí A β). Amyloidní depozita jsou primární faktor, který spouští lokální zánět. (Sharma V. et al., 2012)

Hlavní neuropatologické známky AD jsou přítomnost extracelulárních amyloidních plaků, které jsou složeny z amyloidu beta 40 a 42 (A β 40; A β 42), kde A β 42 tvoří dominantní část amyloidních depozit a intracelulární neurofibrilární klubka (NFT – neurofibrillary tangles), která jsou složena z hyperfosforylovaného proteinu tau. (Anoop A. et al., 2010; Capule Ch.C.& Yang J., 2012) Dochází ke ztrátě cholinergních neuronů a synapsí v mozku, tato neuronální smrt je převážně přítomna v celém bazálním předním mozku, amygdale, hipokampu a kortikální oblasti. (Borlongan C. V., 2012) Abnormality v synapsích u AD mozkové tkáně byly zaznamenány již více než před 40 - ti lety (Gonates N.K. et al., 1967). Dochází k poškození až 45 – ti% synaptických spojů u AD pacientů ve srovnání se zdravými jedinci. Tyto synaptické změny byly nalezeny speciálně v neokortexu a hipokampu. Ztráta těchto důležitých spojů odpovědných za neuronální komunikaci může představovat hlavní morfologické změny přímo spojené s kognitivním zhoršením u AD pacientů. (Pozueta J. et al., 2012) Tyto procesy postihují

zprvu tedy tzv. cholinerní systém. Na přenosu nervových vzruchů v tomto systému se podílí neuropřenašeč acetylcholin, který je důležitým činitelem v zachování kognitivních funkcí, pozornosti, paměti a schopnosti učení.

Předpokládá se, že do určité míry je mozek schopen tento toxický proces kompenzovat, toto může trvat i 10 až 15 let do vypuknutí klinických symptomů. Z tohoto důvodu jsou proteiny zapojené v patogenezi AD slibnými biomarkery v identifikaci časných počátků choroby. (Baron R., et al., 2007)

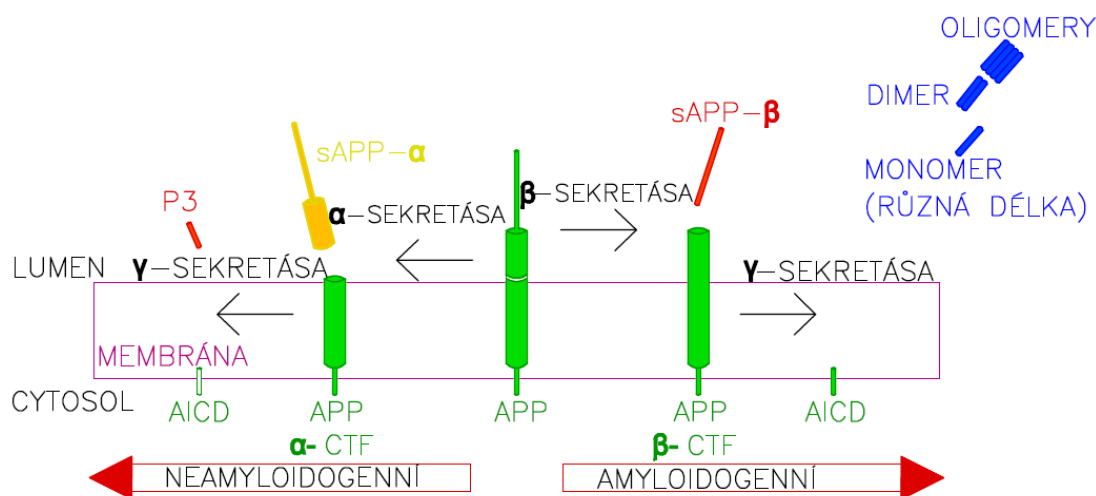
V patologické kaskádě AD jsou stěžejní tyto proteiny:

2.1.4.1 Amyloidový prekurzorový protein (APP)

APP je základní membránový glykoprotein exprimovaný v mozku a CNS. Jeho fyziologickou funkcí je regulovat synaptické funkce a neuronální aktivitu.

Podstupuje sekvenční proteolytické štěpení dvěma cestami: α cestou a β cestou (obr.1). U zdravého člověka je APP štěpen převážně enzymem α – sekretasou (EC 3.4.24.81), ta odštěpuje extracelulární fragmenty o délce 1 - 39 aminokyselin (AMK – aminokyselina). α - sekretasový sestřih je APP neamyloidogenní. U Alzheimerovy choroby je APP štěpen převážně β – sekretasou a následně γ – sekretasou blíže N - terminálního konce. Tyto enzymy odštěpují delší fragmenty β - peptidu o 40 - 43 aminokyselinách. β - sekretasová (BACE1) cesta tedy vede k tvorbě A β deposit, kde A β 42 je dominantní komponentou plaků pozorovaných u AD pacientů. 42 AMK dlouhá A β isoforma (A β 42) je vysoce hydrofobní a tvoří oligomery a fibrily, která se akumulují jako extracelulární plaky.

Patologická funkce APP spočívá v jeho amyloidogenním procesu. Bylo rozpoznáno mnoho APP mutací způsobujících autosomálně dominantní časný počátek AD. (Dong S. et al., 2012; Zeman M. & Jiráček R., 2012; Anoop A. et al., 2010)



Obr. 1 Proteolytické štěpení APP.

V β cestě je APP zpočátku sestřiženo β - sekretasou k uvolnění sAPP β (solubilní APP β) do extracelulárního prostoru a uvnitř membrány zůstává 99 - amino kyselin dlouhý C - terminální fragment (CTF - 99). CTF - 99 je postupně zpracován γ - sekretasou za uvolnění A β a APP intracelulární C - terminální domény (AICD). V α cestě je APP štěpen nejdříve α - sekretasou za následného uvolnění sAPP α , a poté γ - sekretasou za odštěpení neamyloidogenního fragmentu A β zvaného P3. (Dong S. et al., 2012; Fagan A.M. & Perrin R.J.)

2.1.4.2 Amyloid beta (A β)

A β je hlavním činitelem a iniciačním faktorem patofyziologie nemoci. Akumulace A β je přítomna i u kognitivně nepostižených starých lidí. Nález současností studii postulují, že A β depozita u starších lidí bez demence mohou mít vliv na široký strukturální systém, ačkoli není jasné, zda lidé s vyšší úrovní A β budou progredovat do AD. Jsou tedy nutné další studie odhalující efekt vyšších hodnot β - amyloidu pozorovaných u normálního stárnutí. (Oh H. et al., 2011)

A β je produktem štěpení APP. Mezi zdroje A β patří krevní destičky, kožní fibroblasty a je také produkován nervovými buňkami mozku. O 12 hodin později je z mozku sekretován do CSF, poté o 24 hodin později přechází přes hematoencefalickou bariéru do krve (A β clearance). Finální degradace probíhá v retikuloendoteliálním systému. (Shoji M., 2012; Seman P. & Seman N., 2011)

Poté co je A β syntetizován buňkami mozku je jeho molekula flexibilní a nesložená. Působením různých faktorů se A β složí do tvaru, který je znám jako β - skládaný vzor. A β molekula se páruje s dalšími A β molekulami a vytváří dimery, trimetry a multimery (buď v neposkládané nebo poskládané formě) nebo oligomerní shluky. (Seman P. & Seman N., 2011) Tyto oligomery jsou velmi neurotoxické. Oligomery působí jako patogenní ligandy, které se připojují na synapse a poškozují neurony. Důsledkem je řada neurodegenerativních procesů, jako je inhibice dlouhodobé potenciace, oxidační stres, poškození synapsí a také hyperfosforylace intraneuronálního tau proteinu. V lidském mozku jsou ve velmi časném stádiu AD oligomery beta akumulovány okolo neuronů. (Pozueta J. et al., 2012) Další A β molekuly se připojují jedna k druhé, agregují a tvoří A β fibrily a nakonec plaky. Amyloidní plaky - depozita byla nalezena vně nervových buněk (neuronů). (Woo H. et al., 2011) Molekula A β 42 má přirozený sklon vytvářet páry s dalšími A β molekulami. Tento párovací proces začíná uvnitř lidských neuronů. Působení A β na nervové membrány způsobuje otevření kalciových iontových kanálů s korespondujícím poškozením neuronů, poškozením elektrického potenciálu (zřejmě souvisí s pamětí) a

snížením synaptických spinů v některých mozkových oblastech. (Seman P. & Seman N., 2011)

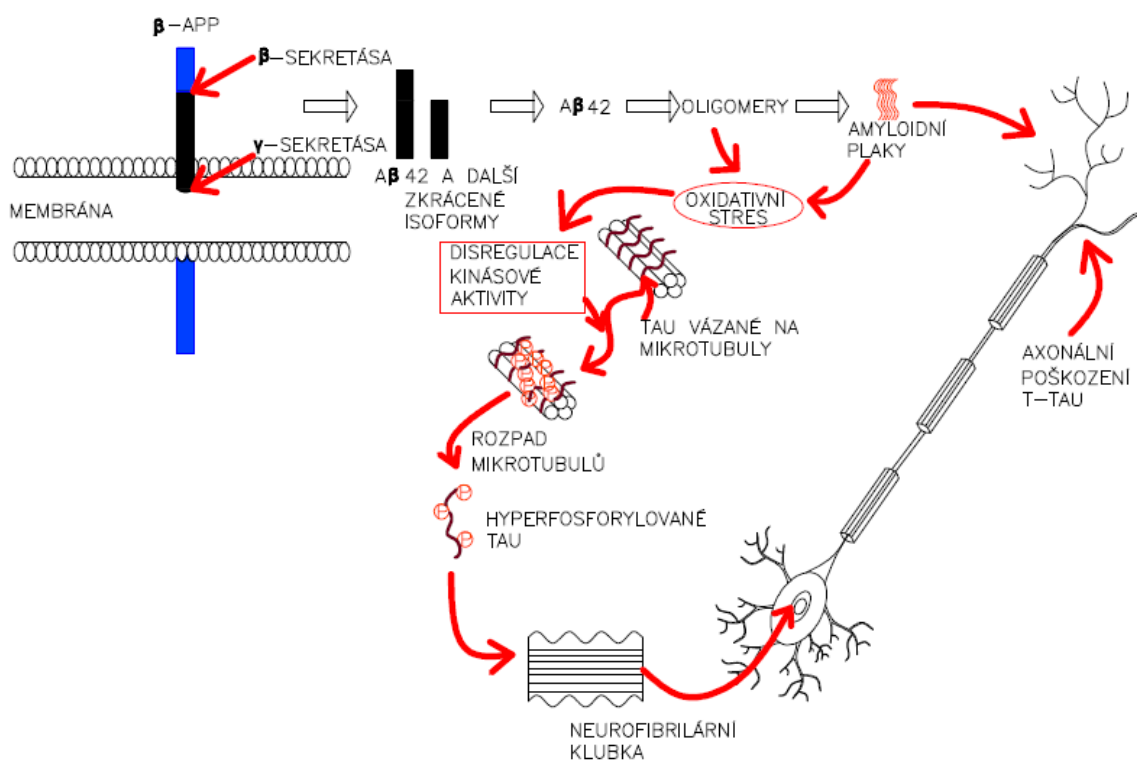
A β je tedy schopen přijmout mnoho různých agregačních forem zahrnujících amyloidní fibrila, právě tak jako nefibrilární struktury (solubilní A β 42 oligomery). Není dobře známo, který z A β 42 forem je nejvíce odpovědný za AD. (Bartl J. et al., 2013)

2.1.5.3 Tau protein

Tau protein je intracelulární protein, který je syntetizován uvnitř neuronů a lokalizován v axonech, kde poskytuje stabilitu a komplexnost mikrotubulů v neuronech a má důležitou funkci v axonálním transportu. U normálních jedinců je přítomna pouze nízká koncentrace tau proteinu v mozkomíšním moku (cerebrospinal fluid – CSF). Funkce tau proteinu je úzce regulována množstvím post-translačních modifikací zahrnujících fosforylaci serinových a threoninových reziduí. (Koudelková M., 2009; Anoop A. et al., 2010)

2.1.4.4 PHOSPHO-TAU protein (p-tau)

Během AD progresu je tau protein hyperfosforylován a postupně disociuje z mikrotubulů a vytváří dvojice spirálových (helikálních) filament, která vytvářejí intracelulární neurofibrilární klubka (NFT). Výsledkem je zánik neuronů a vznik demence. Tento fosforylovaný tau protein => phospho - tau, je dalším ze specifických markerů detekovatelných u AD. (Koudelková M., 2009; Anoop A. et al., 2010)



Obr.2: Patologická kaskáda Alzheimerovy choroby.

Proteolytický sestřih APP nejprve β - sekretasou následován γ - sekretasou produkuje $A\beta_{42}$ a další krátké $A\beta$ fragmenty. Následná agregace $A\beta_{42}$ má za následek tvorbu oligomer a amyloidních vláken. Amyloidní vlákna jsou posléze ukládána jako senilní plaky. Toxicita oligomerů a amyloidních fibril vede ke kaskádě tau - hyperfosforylace, tau protein je původně vázán na mikrotubulech, kterým poskytuje stabilitu. Po hyperfosforylaci tau protein disociuje z mikrotubulů a agreguje do NFT, což následně způsobuje zvýšení cytoskeletární flexibility a neuronální smrt (obr.2). (Anoop A. et al., 2010)

2.1.5 Rizikové faktory

Výskyt demencí během 20 - ti let sledování byl významně predikován vysokým věkem, nízkou vzdělaností (<10 let), hypertenzí, hypercholesterolémií a obezitou. Zvýšený systolický krevní tlak a vysoká koncentrace cholesterolu v séru a speciálně kombinace těchto rizik ve středním věku zvyšuje riziko AD v pozdním věku. Hypertenze a diabetes byly pozitivně asociovány s kognitivním poklesem v 6 let trvajícím studii, zaměřené na populaci v pozdním středním věku. (Stefanova E. et al., 2012)

- ✓ **věk** - Jeden ze základních faktorů. U lidí před 60 - tím rokem se s nemocí setkáváme spíše vzácně. U lidí nad 85 let trpí chorobou každý pátý.
- ✓ **pohlaví** - V tomto ohledu jsou ženy ohroženy o trochu více než muži, za což jsou zodpovědné nejspíše hormony nebo obecně delší průměrná délka života. Starší ženy po menopauze, které už nemají ochranný účinek estrogenu mají vyšší riziko AD. (Wang K. et al., 2012). Vědci dokázali, že ženy které užívají hormon estrogen jsou vystaveny menšímu riziku Alzheimerovy nemoci či jiných demencí.
- ✓ **genetické předpoklady** - Také ovlivňují výskyt AD. U blízkých příbuzných (rodiče, děti, sourozenci) je výskyt 3 – 4× větší, ovšem je o mnoho slabším rizikovým faktorem než je věk! Geny hrají daleko významnější roli u malého procenta lidí, kteří trpí formou nemoci s časným začátkem. Tato nemoc se vyskytuje v rodinné anamnéze u 40 - ti% postižených, ovšem tento proces je velmi vzácný! (Bragdon A.D. & Gamon D., 2002)
- ✓ **vzdělání** - Podle výsledků mnoha studií člověk, který je ve vzdělávacím procesu více než 10 let má 4× nižší pravděpodobnost výskytu AD.
- ✓ **kouření** - Studie prokazují, že kouření přináší vyšší riziko vzniku demence.
- ✓ **alkohol** - Dlouhodobá konzumace většího množství alkoholu s sebou přináší větší riziko onemocnění. Všechny výzkumy publikované během posledních 10 - ti let naznačují, že lehké užívání alkoholu může být asociováno s redukcí rizika

u nespecificky se vyskytujících demencí a AD. Mírné požívání alkoholu (hlavně víno – červené - antioxidační efekt polyfenolů hojných ve víně) naopak chrání vůči demenci cestou snížení vaskulárních rizikových faktorů. Víno má také protektivní efekt vůči škodlivým účinkům kouření. (Panza F. et al., 2012)

- ✓ **hypertenze** – V patogenezi nemoci je důležitá hypertenze. U AD se objevují mikrovaskulární patologické změny. (Tariska P. et al., 1997)
- ✓ **celkový cholesterol** - Celkový cholesterol v séru byl spojen s nárůstem rizika AD, dokonce mírně zvýšená hladina cholesterolu. (Stefanova E. et al., 2012) Cholesterol vede k buněčné inhibici α - sekretasy, která je zodpovědná za neamyloidogenní štěpení APP, tím způsobuje zvýšení A β tvorby cestou aktivace β - a γ - sekretas. Naopak snížení hladiny cholesterolu má za následek snížení A β tvorby. Tyto nálezy ukazují, že hypercholesterolemie způsobuje zvýšení rizika AD. (Umeda T. et al., 2012)
- ✓ **hyperhomocysteinémie (HHcy)** - Homocystein je meziprodukt methioninového cyklu. Jeho tvorba vyžaduje přítomnost folátů a vitamínu B. Ačkoli není plně prostudována biologická asociace mezi HHcy a AD, existuje mnoho možných mechanismů. Tyto mechanismy zahrnují mikrovaskulární poškození, oxidativní stres a také přímé změny v metabolické cestě APP. Současné studie potvrzují, že HHcy navozuje A β navýšení a kognitivní deficit. Naopak snížení hladiny HHcy zlepšuje některé důležité AD neuropatologické rysy jako je kognitivní deficit, hladinu A β depozit v mozku a oxidativní stres u zvířecích modelů. (Zhuo J. & Pratico D., 2010)
- ✓ **diabetes mellitus** - Hyperglykémie snižuje aktivitu mitochondriálního komplexu I inzulínovou resistencí, která je asociována s diabetem II. typu. Inhibice komplexu I vytváří enviromentální oxidativní stres, který nakonec vede k agregaci β - proteinu s následnou neuronální smrtí. (Domínguez R.O. et al., 2012) Biochemická analýza podporuje vztah mezi AD a inzulínovou dysfunkcí. Poškozená inzulínová odpověď v mozku, která může urychlit tvorbu neurofibrilárních klubek je asociována se zvýšeným rizikem AD u pacientů s diabetem II. typu. (Wang K. et al., 2012) Dalším faktorem působícím v patogenezi AD je dysregulace metabolismu glukósy v mozku. Normální metabolismus glukósy v mozku je nezbytný pro zajištění kognitivních funkcí. (Zeman M. & Jirák R., 2012)
- ✓ **poranění hlavy** - V anamnéze pacientů s AD se poranění hlavy vyskytuje 2x častěji. Za poranění hlavy se považuje takové zranění, při kterém dojde ke ztrátě paměti nebo posttraumatické amnézii trvající více než 30 minut. Nejvíce jsou ohroženy skupiny lidí, kteří jsou často vystaveni poškození hlavy, těmi jsou např.

boxeři, fotbaloví hráči, tito lidé mají zvýšené riziko demence, kognitivního zhoršení v pozdějším věku a výskyt tau klubek při autopsii. (Thies W. & Bleiler L., 2012)

- ✓ **volné radikály** – Toxické sloučeniny, které ničí mozkovou tkáň. Po poranění může mozek produkovat vysoce reaktivní molekuly vodíku, kyslíku a železa s nespárovanými elektrony, tedy volné radikály. Radikály proděraví buněčnou membránu, načež z buňky uniknou látky nezbytné pro přežití a vniknou do ní toxiny. Za příčinu zvýšení produkce volných radikálů, která vede ke zvýšení oxidačního poškození mozkové tkáně je považováno i samotné stárnutí. (Bragdon A.D. & Gamon D., 2002)
- ✓ **deprese** - Starší lidé s depresí mají 3 - 4× větší riziko propuknutí demence.
- ✓ **stres** – Stresový hormon kortizol je látka toxická pro mozek. Kortizol snižuje energetické zásobení mozku glukósou, toto vyvolává vnitřní zmatenost a potíže s krátkodobou pamětí. Vysoké hladiny kortizolu vyvolané v důsledku dlouhodobého stresu mohou mozkové buňky zahubit tím, že podporují produkci volných radikálů. (Bragdon A.D. & Gamon D., 2002)
- ✓ **obezita** - Jak vysoká tak i nízká hodnota BMI (Body mass index) je spojena s kognitivním zhoršením a demencí, zahrnující také AD. Vysoká hodnota BMI ve středním věku je rizikovým faktorem AD, naopak vysoká BMI hodnota v pozdějším věku má protektivní efekt. (Vidoni E.D. et al., 2011)

2.1.6 Stádia nemoci

Rozlišení od příznaků doprovázejících klinicky normální stárnutí nemusí být zpočátku jednoduché. Není totiž jasné, jak dlouho trvá preklinické stádium nemoci, které zahrnuje vývoj choroby do prvních klinických příznaků a je pravděpodobné, že trvá nejméně několik let.

Mild cognitive impairment (MCI)

Jedná se o prodromální (období bez klinických příznaků) úroveň AD. MCI tedy představuje stádium mezi kognitivními změnami normálního stárnutí a demencí. Stanovení MCI je důležité, protože představuje vysoké riziko vývoje demence. Tito jedinci nevykazují obvykle přijatá kritéria demence. Zde se silně uplatňuje stanovení biomarkerů z CSF (β - amyloid, tau, p - tau), které jsou vysoce sensitivní pro diagnostiku AD, ale i předpovědi počátku AD z MCI. (Shoji M., 2012; Shoji M., 2011; Geda Y.E., 2012)

První stádium (mírná forma) – trvá dva až čtyři roky

Druhé stádium (středně těžká forma) – trvá od dvou do deseti let

Třetí stádium (těžká forma) – trvá jeden až tři roky

V konečných stádiích Alzheimerovy choroby již destruktivní proces v mozku zničil prakticky všechny nervové buňky mozkové hemisféry kromě té části mozkové kůry, která řídí motorickou činnost a zrak. (Callone P.R. et al.,2008)

2.1.7 Diagnostika

Definitivní diagnóza AD vyžaduje post - mortem identifikaci přítomnosti dvou známek mozkových lézí – extracelulární depozita A β peptidu (amyloidní plaky) a intraneuronální akumulace hyperfosforylovaného tau proteinu (neuronální klubka). Klinická diagnóza AD během života je založena na směrnících ustanovených v roce 1984 the National Institute of Neurological Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS - ADRDA), která dělí diagnózu na pravděpodobnou, možnou, nepravděpodobnou a jistou. V roce 2007 postulovala skupina vědců vedená profesorem Duboisem nová kritéria diagnostiky Alzheimerovy choroby, vycházející z biologických markerů této nemoci. Diagnóza Alzheimerovy nemoci je často velmi komplexní otázkou. (Fagan A.M. & Perrin R.J., 2012; Giorgio A. & De Stefano N., 2013; Jiráček R., 2011)

2.1.7.1 Hlavní diagnostická kritéria NINCDS-ADRDA:

A. Přítomnost časného a signifikantního narušení paměti.

Podporující nálezy (ke kritériím připojeny později):

B. Přítomnost mediální temporální atrofie.

C. Abnormální biomarkery v CSF.

D. Specifický nálezn funkčního zobrazení metodou PET (pozitronová emisní tomografie)

E. Průkaz autosomálně dominantních mutací v rodině vztahující se k Alzheimerově chorobě. (Jiráček R., 2011)

- Pravděpodobná Alzheimerova choroba: je potvrzená demence klinickým i neuropsychologickým testováním. Porucha kognitivních funkcí je progredientní a je přítomna ve dvou či více oblastech kognice. Začátek klinických příznaků je mezi 40 – 90 - tým rokem života. Nesmí být přítomna jiná porucha, která vede ke vzniku demence.
- Možná Alzheimerova choroba: je přítomen syndrom demence s atypickým začátkem, klinickým obrazem nebo progresí bez známé etiologie, ale není přítomno onemocnění, kterým by bylo možné demenci vysvětlit.

- Npravděpodobná Alzheimerova choroba: u pacienta je přítomen syndrom demence s náhlým začátkem, fokální neurologické příznaky nebo záchvaty či poruchy chůze časně v průběhu choroby.
- Jistá Alzheimerova choroba: pacient splňuje kritéria pro pravděpodobnou AD a je podán histopatologický důkaz biopsií nebo autopsií. (Jiráček R., 2011)

2.1.7.2 Vyšetření pacienta

Pacienti podstupují řadu vyšetření jako jsou psychometrické testy a také MRI (magnetická resonance) – odhalující lehkou hipokampální atrofii. Atrófie hipokampu je prokazatelná již několik let před počátkem demence a může být prognostickým faktorem pro přechod MCI do demence. (Geda Y.E., 2012)

Současné pokroky v zobrazovacích technikách poskytují strukturu a fyziologii mozku AD jedinců, ovšem biomarkery založené na CSF reprezentují přímé a nejvíce vhodné poznatky ve studiu progresu nemoci. Biomarkery jsou užitečné v detekci preklinických příznaků, právě tak jako symptomatických stádií AD. Klinické symptomy AD jsou diagnostikovány ve starším věku. Degenerativní proces pravděpodobně začíná mnoho let před klinickým počátkem nemoci. Biomarkery jsou esenciální částí léčby nemoci a jsou nezbytné pro diagnózu, monitoring progresu nemoci, detekce časného počátku nemoci, sledování terapeutického efektu, tedy vyvarování chybného stanovení diagnózy nemoci. (Anoop A. et al., 2010)

2.1.7.3 Vyšetření mozkomíšního moku – biomarkery AD : ↓ beta amyloid, ↑ tau protein, ↑ p - tau

Vyšetření AD biomarkerů patří do oblasti speciální likvorologie. V rámci případné širší diferenciální diagnostiky je velmi přínosné mozkomíšní mok před vyšetřením AD biomarkerů podrobit i základnímu vyšetření:

1. určení permeability hematoencefalické bariéry, především výpočtem albuminového kvocientu
2. stanovení koncentrace glukózy a laktátu v likvoru a v krvi a vypočtení koeficientu energetické bilance
3. stanovení buněčnosti a zhodnocení cytologického obrazu likvoru

Dále rozšířenému základnímu vyšetření (vyšetření imunoglobulinů s výpočtem intratekální syntézy imunoglobulinů, vyšetření zánětlivých a destruktivních parametrů, vyšetření komplementu) k odhalení jiných příčin demence.

Poté nastupuje speciální likvorologie do které zahrnujeme i vyšetření tripletu. Abnormální výsledky mohou předcházet klinickou manifestací onemocnění o 1 - 2 roky, a tím by mohla být započata včasná terapie. (Koudelková M., 2010)

2.1.8 Terapie

Jedny z hlavních léků jsou **kognitiva**, která v počátečních stádiích nemoci zlepšují takzvané kognitivní funkce (myšlení, paměť či orientaci). Pomáhají v mozku zabránit odbourávání potřebného acetylcholinu (nutný pro přenos nervových signálů). Inhibitory acetylcholinesterasy (EC 3.1.1.7) donepezil, galantamin, rivastigmin, u kterých byl dokázán účinek v období mírné, středně pokročilé i těžké demence.

Dalšími využívanými léky jsou **hypnotika** (pro poruchy spánku), **neuroleptika** (pro odstranění agresivity a neklidu), **antidepresiva** (zmírňují deprese) a **anxiolytika** (utlumují úzkost).

Nefarmakologické intervence - postupy určené ke zlepšení kognitivních funkcí – např. kognitivní stimulace či kognitivní trénink (často ve skupině) zaměřené na multikomponentní ovlivnění (pozornost, paměť, orientace, jazyk).

Samozřejmě neustále dochází k pokusům vyvíjet mnoho nových látek s terapeutickým účinkem mezi které patří např. A β vakcína nebo γ - sekretasový inhibitor, dokonce i mnoha směry probíhající výzkum kmenových buněk. (internet 2, 3)

3 Praktická část

3.1 Biologický materiál

Biologický materiál použitý při analýze je mozkomíšní mok. Při zpracování biologického materiálu je důležitá preanalytická fáze, která může značně ovlivnit výsledek vyšetření. Mezi preanalytické postupy patří operace od žádosti o analýzu až po zahájení analyzování vzorku, což zahrnuje přípravu nemocného na odběr, odběr materiálu, jeho uchovávání a transport do laboratoře. (Koudelková M., 2009)

3.1.1 Likvor (mozkomíšní mok-cerebrospinal fluid-CSF)

CSF je průhledná tělní tekutina, která obklopuje subarachnoidální prostor a ventrikulární systém v okolí mozku. CSF působí jako kapalný „polštář“ poskytující základní mechanickou a imunologickou ochranu mozku uvnitř lebky.

Získává se cestou lumbální punkce. Odběr malého množství mozkomíšního moku z páteřního kanálu v oblasti bederní páteře. Ačkoliv lumbální punkce je invazivní a pro pacienta bolestivá, CSF je nejvíce informativní kapalný biomarker zkoumaný v prognóze neurodegenerativních chorob. Ideální biomarker by měl být vysoce specifický a měl by odrážet stupeň odpovědi na léčbu a předpovídat přesně průběh nemoci.

Proteiny které přímo odrážejí specifické aktivity mozku difundují do CSF lépe než do jiných tekutin. Tyto proteiny a metabolity mohou sloužit jako výborný biomarker pro AD. Jako časný informační zdroj vývoje AD, např MCI, kde správná diagnóza je stěžejní. (Anoop A. et al., 2010)

3.1.2 Odběr, skladování a transport CSF

Pacient by měl podstoupit lumbální punkci ráno, po celonočním půstu. Lumbální punkce by měla být prováděna na úrovni L3/L4 nebo L4/L5 (bederní obratle - vertebrae lumbales, L1-L5). Odebírá se nejméně 4 ml CSF do polypropylénových zkumavek.

Vzorky CSF by neměly být déle než 4 hodiny při 4 – 20 °C před tvorbou alikvotů. Vzorky skladujeme při -80 °C až do testování. Je třeba vyhnout se rozmrazování vzorků, opakované mrznutí/tání má za následek chybné hodnoty koncentrace.

Po odebrání by měl následovat co nejrychlejší transport do laboratoře, transportuje se na chladu.

3.1.3 Výběr skupiny pacientů

Pacienti jsou vybíráni na základě diagnózy. Pro výběr diagnózy bylo potřeba

nastudovat literaturu o tomto typu onemocnění a vybrat klinické příznaky pacientů, na základě kterých jsou formulovány diagnózy. Na základě dat byla vybrána skupina diagnóz, které se spojují s daným onemocněním nejčastěji nebo jsou pro něj přímo typické. Veškeré informace o pacientech jsou získávány z LISu (laboratorní informační systém) nazývaného OpenLims a z nemocničního informačního systému MEDEA.

Počet vzorků v měřeních:

1., 3., 4. měření – 34 vzorků pro phospho - tau protein a A β ; 36 vzorků pro tau protein
2.měření – 28 vzorků pro phospho - tau a A β ; 30 vzorků pro tau protein

Celkový počet změřených pacientů : 138

Tab. 1 Diagnózy měřených pacientů:

G629	Polyneuropatie NS	R69	Neznámé a neurčené příčiny nemocnosti
I64	Cévní mozková příhoda	G98	Jiné poruchy NS nezařazené jinam
G98	Jiné poruchy NS	M5312	Cervikobrachiální syndrom, krční krajina
G20	Parkinsonova choroba	F03	Neurčená demence
G35	Roztroušená skleróza	D470	Novotvary nejist. a nezn. chování z histiocytů a kmen. buňek
R51	Bolest hlavy NS	G448	Jiné určené syndromy bolesti hlavy
A692	Lymeská nemoc	R55	Mdloba-synkopa, zhroucení
G510	Bellova obrna	D860	Sarkoidóza plic
G511	Onemocnění lumbál. aj. meziobratl. plotének	M5446	Lumbago s ischiasem, bederní krajina
G959	Nemoci míchy NS	Z501	Jiná fyzikální léčba
E889	Poruchy metabolismu NS	G430	Migréna bez aury
I693	Následky mozkového infarktu	G969	Porucha cervikální nervové soustavy NS
I672	Mozková ateroskleróza	E148	Neurčený diabetes mellitus s neurčenými komplikacemi
G258	Jiné určené extrapyramid. a pohyb. poruchy	M5447	Lumbago s ischiasem, bederní-křížová krajina
R410	Dezorientace NS	H814	Závrat' - vertigo, centrálního původu
M5422	Cervikalgie krční krajiny	C621	ZN - sestouplé varle
C910	Akutní lymfoblastická leukémie	R42	Závrat'
D869	Sarkoidóza NS	G610	Guillain - Barré syndrom
G219	Sekundární parkinsonismus NS	M7967	Bolest v končetině, kotník a noha pod ním
G300	Alzheimerova nemoc s časným začátkem	R298	Jiné neurč. příznaky a znaky týkající se nervosval. a koster. soustavy
J180	Bronchopneumonie	K922	Krvácení ze žaludku a střev NS

3.2 Chemikálie

Pro měření byly na základě prostudování nabídky trhu vybrány ELISA kity od firmy INNOGENETICS: INNOTEST hTAU Ag; β -amyloid₍₁₋₄₂₎ a PHOSPHO-TAU_(181P). Jedná se o triplet biomarkerů vhodný ke stanovení diagnózy Alzheimerovy choroby. Na trhu je zatím omezené množství těchto detekčních kitů. Existují také kity pro stanovení dubletu - Amyloid Beta 42 peptidu a Tau proteinu (př.Lab Test), ovšem triplet, tedy kombinace tří markerů nabízí přesnější vyhodnocení a třetí marker PHOSPHO-TAU zvyšuje schopnost správného stanovení.

Souprava určená pro stanovení hTAU Ag proteinu, celkem pro 84 vzorků

Destička potažená protilátkou - 1x96 jamek (12x8 potažených testovacích jamek a sáček silikagelu, jako sušidlo).

Sample Diluent – 1x20 ml (Fosfátový pufr se stabilizujícími proteiny a 0,05% Proclin 300 jako ochranou, tento diluent se také užívá jako blank).

Conjugate 1 – 1x0,2 ml (2 monoklonální protilátky anti - hTAU, značené biotinem, ve fosfátovém pufru se stabilizujícími proteiny a 0,03% Proclin 300 jako ochrana, před použitím ředíme 100x Conjugate Diluentem =>Conjugate Working solution 1 musí být připraven čerstvý!).

Conjugate 2 – 1x0,2 ml (Peroxidasa - značený streptavidin obsahující Proclin 300 jako ochranu, ředíme před použitím 100x Conjugate Diluentem => Conjugate working solution musí být připraven čerstvý!).

Conjugate Diluent – 1x30 ml (Fosfátový pufr se stabilizujícími proteiny a 0,03% Proclin 300 jako ochranu, používáme k ředění koncentrovaných konjugátů (Conjugate 1, 2)).

Substrate TMB – 1x0,3 ml (Tetrametyl benzidin (TMB) rozpuštěný v dimetyl sulfoxidu (DMSO). Ředíme před užitím 100x Substrate Buffer. Substrate working solution by měl být připraven čerstvý! Koncentrovaný TMB může krystalizovat, a proto by měl být kompletně rozpuštěn před použitím – rozpouštět při 18°C)

Substrate Buffer – 1x30 ml (Fosfát - citrátový pufr obsahující 0,02% H₂O₂ , používáme k ředění Substrate TMB).

Wash Solution – 1x60 ml (Fosfátový pufr obsahující 0,15 Proclin 300, je ředěn 25x před použitím destilovanou nebo deionizovanou vodou. Připravíme přinejmenším 40 ml ředěného promývacího roztoku pro každou testovací jamku. V koncentrovaném promývacím roztoku se mohou při skladování při 2 - 8 °C tvořit solné krystalky. Tyto krystaly musí být

kompletně rozpuštěny. Promývací roztok je stabilní 24 hodin při pokojové teplotě 18 - 30 °C).

hTAU Standard – 3 víálky (Obsahují lyofilizovaný (zmrazený) rekombinantní hTAU standard. Rozředěný standard je stabilní 6 týdnů při 6 - 8 °C).

Destičkové pečetidlo – 4

Minigrip bag – 1 (pro skladování nepoužitých stripů).

Spotřební materiál a pomůcky

- 3x kádinka 20 ml; 1x kádinka 1000 ml; 1x kádinka 50 ml; 1x válec 10 ml; 2x válec 12 ml; 1x válec 30 ml; 1x válec 1000 ml; 1x válec 20 ml; 1x válec 5 ml; 1x válec 50 ml

- buničina, ependorfky (1,5 – 2 ml)

- multikanálová pipeta 30 – 300 µl

- pipety – 5 – 2000 µl

Souprava určená pro stanovení PHOSPHO - TAU_(181P) Ag, celkem pro 82 vzorků

Destička potažená protilátkou – 1x96 (12x8 potažených testovacích jamek a sáček Silikagelu, jako sušidlo).

Sample Diluent - 1x30 ml (Fosfátový pufr se stabilizujícími proteiny 0,01%MIT/0,1% CAA jako ochrana, užíváme k ředění standardu).

Conjugate 1 – 1x0,2 ml (Biotinilované anti – PHOSPHO - TAU_(181P) (AT270bio) ve fosfátovém pufru se stabilizujícími proteiny 0,01%MIT/0,1% CAA jako ochrana. Ředíme 100x před použitím s Conjugate Diluent 1. Conjugate working solution má být připraven čerstvě!).

Conjugate 2 – 1x0,3 ml (Peroxidasou - značený streptavidin obsahující 0,02% MIT a 0,02% bromonitrodioxanu jako ochrana. Ředíme před použitím 100x s Conjugate Diluent 2. Conjugate working solution 2 musí být připraven čerstvý!).

Conjugate Diluent 1 – 1x20 ml (Fosfátový pufr se stabilizujícími proteiny a 0,01%MIT/0,1%CAA jako ochrana (purpurově zbarvený roztok) používáme pro ředění Conjugatu 1).

Conjugate Diluent 2 – 1x30 ml (Fosfátový pufr obsahující 0,05% Proclin 300 jako ochranu (zeleně zbarvený roztok), používáme k ředění Conjugatu 2.

Substrate TMB – 1x0,3 ml (Tetrametyl benzidin (TMB) rozpuštěný v dimetyl sulfoxidu (DMSO). Ředíme před užitím 100x Substrate Buffer. Substrate working solution solution by mělbýt připraven čerstvý! Koncentrovaný

TMB může krystalizovat, a proto by měl být kompletně rozpuštěn před použitím – rozpouštět při 18°C)

Substrate Buffer – 1x30 ml (Fosfát - citrátový pufr obsahující 0,006% H₂O₂, používáme k ředění Substrate TMB.

Stop Solution – 1x30 ml (0,9N kyselina sírová)

Wash Solution – 1x60 ml (Fosfátový pufr obsahující 0,01%MIT/0,1%CAA, je ředěn 25x destilovanou nebo deionizovanou vodou před použitím. Připravíme nejméně 40 ml ředěného promývacího roztoku pro každou jamku. . V koncentrovaném promývacím roztoku se mohou při skladování při 2 - 8 °C tvořit solné krystalky. Tyto krystaly musí být kompletně rozpuštěny. Naředěný promývací roztok je stabilní 4 týdny při 2 - 8 °C).

Standard (100000pg/ml) – 3x0,2 ml (3 viálky obsahující 0,3 ml 100000 pg/ml PHOSPHO - TAU (181P) Standard. Vortexujeme 10 minut. K ředění standardu používáme polypropylénové viálky. Naředěné roztoky by měly být po použití vyřazeny).

Destičkové pečetadlo – 8

Minigrip bag – 1 (pro skladování nepoužitých stripů).

Spotřební materiál a pomůcky

- 3x kádinka 20 ml; 1x kádinka 1000 ml; 2x válec 10 ml; 1x válec 15 ml; 1x válec 30 ml; 1x válec 1000 ml; 1x válec 20 ml;
- buničina, endorfky (1,5 – 2 ml)
- multikanálová pipeta 30 – 300 µl
- pipety – 5 – 2000 µl

Souprava pro stanovení β - AMYLOIDU ⁽¹⁻⁴²⁾, celkem pro 82 vzorků

Destička potažená protilátkou – 1x96 (12x8 potažených testovacích jamek a sáček Silikagelu, jako sušidlo).

Sample Diluent – 1x30 (Fosfátový pufr se stabilizujícími proteiny a 0,01%MIT/,1%CAA jako ochranu, používáme k ředění standardu a vzorků s vysokou koncentrací β - AMYLOID ⁽¹⁻⁴²⁾).

Conjugate 1 – 1x0,2 ml (Myší anti – β - AMYLOID ⁽¹⁻⁴²⁾IgG značené biotinem ve fosfátovém pufru se stabilizujícími proteiny a 0,04%MIT/0,1%CAA, jako ochrana. Ředíme 100x s Conjugate Diluent 1. Conjugate working solution 1 je stabilní 24 hodin při pokojové teplotě).

Conjugate 2 – 1x0,3 ml (Peroxidasou - značený streptavidin obsahující 0,02%MIT a

0,02% bromonitrodioxan jako ochranu. Před použitím ředíme 100x s Conjugate Diluent 2. Conjugate working solution 2 musí být připraven čerstvý).

Conjugate Diluent 1 – 1x20 ml (Fosfátový pufr se stabilizujícími proteiny a 0,01%MIT/0,1%CAA, jako ochrana, používáme k ředění Conjugate 1).

Conjugate Diluent 2 – 1x30 ml (Fosfátový pufr obsahující 0,05%Proclin 300, jako ochranu, hovězí kasein jako stabilizátor a hovězí aprotinin jako proteázový inhibitor, používáme k ředění Conjugate 2).

Substrate TMB – 1x0,3 ml (Tetrametylbenzidin (TMB) rozpuštěný v dimetyl sulfoxidu (DMSO). Ředíme 100x před použitím s Substrate Buffer. Substrate Working solution musí být připraven pro každé měření čerstvý!).

Substrate Buffer – 1x30 ml (Fosfát-citrátový pufr obsahující 0,02% H₂O₂ , používáme k ředění Substrate TMB).

Wash solution – 1x60 ml (Fosfátový pufr obsahující 0,01%MIT/0,09%CAA, ředíme 25x destilovanou nebo neionizovanou vodou. Připravíme nejméně 40 ml ředěného promývacího roztoku do každé jamky. V koncentrovaném promývacím roztoku se mohou při skladování při 2 - 8 °C tvořit solné krystalky. Tyto krystaly musí být kompletně rozpuštěny. Naředěný promývací roztok je stabilní 24 hodin při pokojové teplotě).

Standard (99600pg/ml) – 3x0,2 ml (Před použitím necháme standard roztát na stole a poté vortexujeme. Jakmile standard roztaje nemůže být skladován pro další použití. Roztoky musí být vyřazeny. Pro přípravu standardů používáme jen polypropylénové zkumavky).

Stop Solution – 1x30 ml (0,9N kyselina sírová).

Destičkové pečetidlo – 8

Minigrip bag – 1 (pro skladování nepoužitých stripů).

Spotřební materiál a pomůcky

- 3x kádinka 20 ml; 1x kádinka 1000 ml; 1x válec 10 ml; 2x válec 12 ml; 1x válec 30 ml; 1x válec 1000 ml; 1x válec 20 ml
- buničina, ependorfky (1,5 – 2 ml)
- multikanálová pipeta 30 – 300 µl
- pipety – 5 – 2000 µl

3.3 Přístroje

EVOLIS - Evolis systém je plně automatizovaný mikrodestičkový procesor od Bio Rad laboratories.

Pomocné přístroje

Třepačka Wellmix

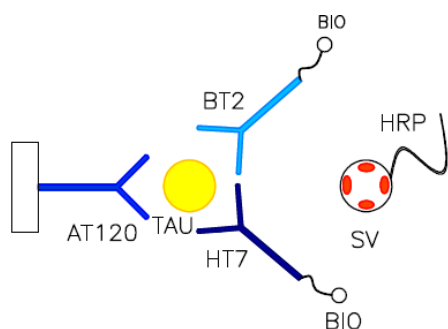
Třepačka Unikat

3.4 Metodika - ELISA

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

K měření se využívá solid - phase enzymová imunoanalýza, která slouží ke kvantitativnímu stanovení markerů v CSF. Metoda je založena na principu sendvičové enzymové imunoanalýzy. Markery jsou nejdříve uchyceny monoklonálními protilátkami (monoklonální protilátka má přesně definované vlastnosti a velice specificky se váže na svůj substrát) kotvenými na mikrotitrační destičce. Poté jsou inkubovány s protilátkami značenými biotinem. Přítomnost vzniklého komplexu Antigen - Protilátka je detekovaná peroxidasou (EC 1.11.1.7) - značeným streptavidinem, kde komplex streptavidin – biotin má pro reakci zesilovací efekt. Po přidání substrate working solution dojde ke zbarvení vzorků (čím je větší koncentrace přítomného markeru, tím je zbarvení intenzivnější). Následuje měření absorbance při 450 nm na přístroji Evolis. (čím je větší naměřená absorbance, tím vyšší je koncentrace).

3.4.1 hTAU protein - princip



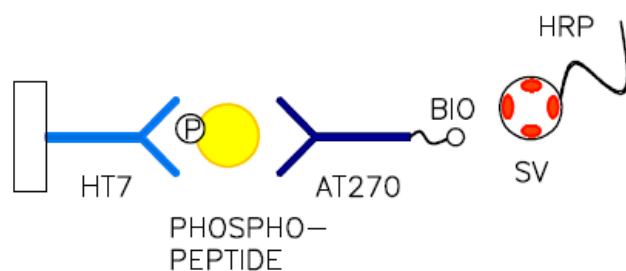
Obr. 3 Princip INNOTEST hTAU Ag (antigen)

(AT120 - kotvicí monoklonální protilátka (IgG1); HT7 + BT2 (IgG1) - detekční monoklonální protilátky (Ab); SV - streptavidin; HRP - křenuv peroxidáza; BIO-biotin)

Na dně jamek mikrotitrační destičky je navázána monoklonální protilátka proti lidskému tau AT120. Do jamek potažených protilátkou jsou přidávány vzorky, popř. standardy, společně s konjugačním pracovním roztokem 1. Jako konjugát 1 slouží

směs dvou biotinylovaných monoklonálních anti - tau specifických protilátek HT7 a BT2. Po inkubaci, během níž probíhá imunochemická reakce tau proteinu s proti protilátkami a po následném odstranění nenavázaných složek promytím je biotin detekován pomocí dalšího konjugačního pracovního roztoku 2, který obsahuje streptavidin s křenovou peroxidasou. Po přidání substrate working solution dojde ke zbarvení vzorků. Po zastavení reakce STOP roztokem měříme do 15 - ti minut absorbanci při 450 nm. (Fialová L. et al., 2011)

3.4.2 PHOSPHO - TAU protein - princip

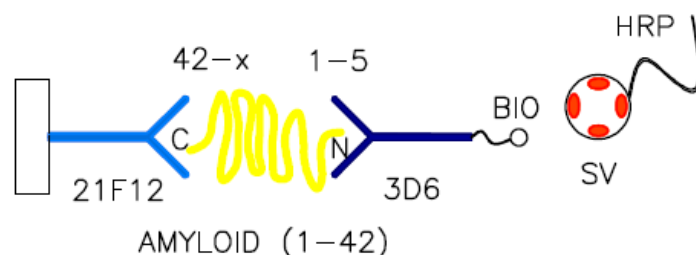


Obr. 4 Princip INNOTEST PHOSPHO - TAU_(181P)

(HT7-kotvicí monoklonální protilátka (IgG1); AT270 (IgG1) - detekční monoklonální protilátka; SV - streptavidin; HRP - křenová peroxidáza; BIO - biotin)

Na dně jamek mikrotitrační destičky je navázána monoklonální protilátka proti PHOSPHO - TAU, HT7. Do jamek potažených protilátkou jsou přidávány vzorky, popř. standardy, společně s konjugačním pracovním roztokem 1. Jako konjugát 1 slouží biotinylovaná monoklonální anti - PHOSPHO-TAU_(181P) specifická protilátka AT270. Po inkubaci během níž probíhá imunochemická reakce proteinu s protilátkami a po následném odstranění nenavázaných složek promytím je biotin detekován pomocí dalšího konjugačního pracovního roztoku 2, který obsahuje streptavidin s křenovou peroxidasou. Po přidání substrate working solution dojde ke zbarvení vzorků. Po zastavení reakce STOP roztokem měříme do 15 - ti minut absorbanci při 450 nm.

3.4.3 β - AMYLOID₍₁₋₄₂₎ - princip



Obr. 5 Princip INNOTEST β - AMYLOID₍₁₋₄₂₎

(21F12 - kotvící monoklonální protilátka (IgG2a); 3D6 (IgG2b)-detekční monoklonální protilátka; SV - streptavidin; HRP - křenová peroxidáza; BIO - biotin)

Na dně jamek mikrotitrační destičky je navázána monoklonální protilátka proti β - amyloidu, 21F12. Do jamek potažených protilátkou jsou přidávány vzorky, popř. standardy společně s konjugačním pracovním roztokem 1. Jako konjugát 1 slouží biotinylovaná monoklonální anti - β - AMYLOID₍₁₋₄₂₎ specifická protilátka 3D6. Po inkubaci během níž probíhá imunochemická reakce proteinu s protilátkami a po následném odstranění nenavázaných složek promytím je biotin detekován pomocí dalšího konjugačního pracovního roztoku 2, který obsahuje streptavidin s křenovou peroxidasou. Po přidání substrate working solution dojde ke zbarvení vzorků. Po zastavení reakce STOP roztokem měříme do 15 - ti minut absorbanční při 450 nm.

3.5 Postup

CSF je uchováván při teplotě -80°C. Vzorky i všechny reagenty je nutné před měřením vytemperovat 30 minut při pokojové teplotě a před vlastním pipetováním každý vzorek promíchat na vortexu.

Tab. 2 Použité vzorky ze všech měření

měření	1.měření			2.měření		
	pohlaví	věk	diagnóza	pohlaví	věk	diagnóza
1.	žena	78	G20	muž	60	G629
2.	muž	51	G20	muž	56	G629
3.	žena	30	G35	žena	66	G629
4.	žena	51	G35	muž	56	G629
5.	muž	59	G35	žena	52	G629
6.	muž	52	G20	žena	49	I64
7.	muž	28	G35	žena	54	G98
8.	muž	26	G35	žena	82	G20
9.	žena	35	G35	muž	86	G20
10.	muž	71	G20	žena	77	G20
11.	muž	72	G20	žena	77	G20
12.	žena	50	G35	žena	54	G35
13.	žena	66	G20	žena	80	G20
14.	žena	45	G35	muž	77	G20
15.	muž	60	G20	muž	76	G20
16.	žena	34	G35	muž	79	G20
17.	žena	33	G35	žena	47	G35
18.	muž	74	G20	žena	64	G219
19.	žena	58	R51	žena	74	G20
20.	muž	35	A692	žena	76	G20
21.	muž	33	G510	žena	73	G20
22.	muž	61	G511	žena	53	G35
23.	muž	40	G959	muž	63	G20

24.	žena	50	G959	žena	70	G20
25.	žena	45	A692	muž	68	G20
26.	žena	53	A692	muž	58	G35
27.	žena	37	G35	žena	66	G20
28.	muž	49	G35	muž	69	G20
29.	žena	100	E889	muž	61	G20
30.	muž	72	I693	žena	68	G510
31.	žena	68	I672	Standard		
32.	muž	58	G258	Standard		
33.	žena	76	R410	Standard		
34.	muž	50	M5422	Standard		
35.	muž	96	C910	Standard		
36.	žena	50	D869	Standard		
	3.měření			4.měření		
	pohlaví	věk	diagnóza	pohlaví	věk	diagnóza
1.	žena	62	G300	žena	71	M5446
2.	žena	67	J180	žena	42	G35
3.	muž	68	G20	žena	65	Z501
4.	žena	79	R69	žena	62	G98
5.	žena	40	G510	žena	57	M5312
6.	žena	56	G35	žena	58	M5446
7.	muž	40	G98	žena	44	G430
8.	muž	20	M5312	žena	72	G20
9.	žena	70	G20	žena	76	G629
10.	žena	50	G20	muž	64	G629
11.	žena	59	F03	žena	46	G969
12.	muž	56	G629	muž	68	G98
13.	muž	86	G20	muž	58	G98
14.	žena	22	G35	žena	44	G35
15.	žena	77	G20	žena	65	E148
16.	muž	25	D470	muž	54	M5447
17.	žena	55	G20	muž	47	H814
18.	žena	76	G20	žena	38	G35
19.	žena	71	G20	žena	54	G35
20.	žena	51	G20	muž	78	C621
21.	žena	73	G20	žena	71	R42
22.	žena	56	G448	žena	47	G219
23.	muž	61	G20	muž	60	G610
24.	žena	30	G35	žena	53	G430
25.	žena	32	G35	muž	41	M7967
26.	žena	27	G35	žena	64	R298
27.	muž	71	G20	žena	48	G968
28.	muž	55	G20	žena	41	K922
29.	žena	56	G20	muž	23	G35
30.	muž	57	G20	žena	35	A692
31.	muž	55	G20	žena	38	G969
32.	žena	51	G20	žena	30	G98
33.	muž	26	G35	muž	69	G98
34.	žena	35	G35	žena	47	A692

35.	žena	45	R55	žena	69	G98
36.	žena	38	G35; D860	muž	54	G20

3.5.1 Tau-protein

Příprava reagensí

- Příprava 500 µl 1200 pg/ml hTAU standardu:
 - lahvičky obsahující lyofilizovaný rekombinantní hTAU standard (c = 1200 pg/ml)
 - jednu lahvičku naředíme přidáním 500 µl Sample Diluentu
 - po naředění necháme stát 15 minut a poté mícháme 15 sekund pomocí vortexu
 - rozpuštěný Standard je stabilní 6 týdnů při skladování v 2 - 8°C

Tab. 3 Ředění standardu pro TAU.

c (pg/ml)	Standard (µl)	Sample Diluent (µl)
1200=>A	lyofil. hTau	500
600=>B	100 z A	100
300=>C	50 z A	150
150=>D	50 z A	350
75=>E	200 z D	200

- Příprava pracovních roztoků
 - Conjugate working solution 1 (konjugační pracovní roztok 1) ředíme 100x:
5 ml Conjugate Diluent + **50 µl** Conjugate 1
 - Conjugate working solution 2 (konjugační pracovní roztok 2) ředíme 100x:
9 ml Conjugate Diluent + **90 µl** Conjugate 2
 - Substrate working solution (pracovní roztok substrátu) ředíme 100x:
12 ml Substrate Buffer + **120 µl** Substrate TMB
 - Wash solution (promývací roztok) ředíme 25x:
30 ml Wash solution + **720 ml** destilované vody
 - Stop solution (Stop roztok):
±2,2 ml H₂SO₄ 95-97% + **33,8 ml** destilované vody

Pracovní návod:

Připravíme si mikrotitrační destičku s potřebným množstvím jamek (48 jamek).

1. Pipetujeme **75 µl** konjugačního pracovního roztoku 1 do každé jamky.
2. Pipetujeme **25 µl** standardu (5 standardů) a **25 µl** blanku = sample diluentu v dupletu, **25 µl** vzorku (36 vzorků, jamky 2E - 6H). Zamícháme pomocí třepačky 1 minutu při 1000 rpm.

Tab. 4 Pipetování standardu a blanku.

standard	standard A		standard B		standard C		standard D		standard E		blank	
jamky	1A	1B	1C	1D	1E	1F	1G	1H	2A	2B	2C	2D

- Zakryjeme adhezivním pečetidlem a inkubujeme přes noc (14 - 18hodin) v inkubátoru při 25+/-2°C.
- Promyjeme 4 x **400 µl** Wash Solution.
- Pipetujeme **100 µl** konjugačního pracovního roztoku 2 do každé jamky.
- Zakryjeme adhezivním pečetidlem a inkubujeme 30+/-3 minuty v inkubátoru při 25+/-2°C.
- Promyjeme 4 x **400 µl** Wash Solution.
- Pipetujeme **100 µl** Substrate Working Solution do každé jamky.
- Inkubujeme 30+/-3minuty při pokojové teplotě (18 – 30°C) **ve tmě**.
- Pipetujeme **100 µl** 2N kys. sírové (Stop Solution) do každé jamky ve stejném pořadí a ve stejném časovém intervalu jako Substrate Working Solution.
- Bezpečně upevníme stripholder k optimálnímu zamíchání (1 minutu při 1000 rpm).
- Čteme (během 15 minut po posledním kroku) při absorbanci 450 nm.

3.5.2 Phospho - tau protein

Příprava reagensí

- Příprava 500 pg/ml PHOSPHO - TAU_(181P) Standardu
- koncentrovaný PHOSPHO - TAU standard (c = 100000 pg/ml) naředíme 200x pomocí Sample Diluentu

$$X = \frac{500 \times 2000}{100000} = 10 \mu\text{l (viz. Tab. 5)}$$

Tab. 5 Ředění standardu pro PHOSPHO - TAU.

c (pg/ml)	Standard (µl)	Sample Diluent (µl)
500=>A	10 µl	1990
250=>B	100 µl z A	100
125=>C	50 µl z A	150
62,5=>D	50 µl z A	350
31,3=>E	100 µl z D	100
15,6=>F	50 µl z D	150

Příprava pracovních roztoků

Conjugate working solution 1 (konjugační pracovní roztok 1) ředíme 100x:

10 ml Conjugate Diluent 1 + **100 µl** Conjugate 1

Conjugate working solution 2 (konjugační pracovní roztok 2) ředíme 100x:

10 ml Conjugate Diluent 2 + **100 µl** Conjugate 2

Substrate working solution (pracovní roztok substrátu) ředíme 100x:

15 ml Substrate Buffer + **150 µl** Substrate TMB

Wash solution (mycí roztok) ředíme 25x:

30 ml Wash solution + **720 ml** destilované vody

Pracovní návod:

Připravíme si mikrotitrační destičku s potřebným množstvím jamek (48 jamek).

1. Pipetujeme **25 µl** konjugačního pracovního roztoku 1 do každé jamky.
2. Pipetujeme **75 µl** standardu (6 standardů) a **75 µl** blanku = sample diluentu v dupletu, **75 µl** vzorku (34 vzorků, jamky 2G - 6H). Zamícháme pomocí třepačky 1 minutu při 1000 rpm.

Tab. 6 Pipetování standardu a blanku.

St.	standard A		standard B		standard C		standard D		standard E		standard F		blank	
	1A	1B	1C	1D	1E	1F	1G	1H	2A	2B	2C	2D	2E	2F
jamky														

3. Zakryjeme adhezivním pečetidlem a inkubujeme přes noc (14 - 18hodin) při 2 - 8°C.
4. Promyjeme 5 x **400 µl** Wash Solution.
5. Pipetujeme **100 µl** konjugačního pracovního roztoku 2 do každé jamky.
6. Zakryjeme adhezivním pečetidlem a inkubujeme 60+/-3 minuty v inkubátoru při pokojové teplotě.
7. Promyjeme 5 x **400 µl** Wash Solution.
8. Pipetujeme **100 µl** Substrate Working Solution do každé jamky.
9. Inkubujeme 30+/-3minuty při pokojové teplotě (18 – 30°C) **ve tmě**.
10. Pipetujeme **50 µl** Stop Solution do každé jamky ve stejném pořadí a ve stejném časovém intervalu jako Substrate Working Solution.
11. Bezpečně upevníme stripholder k optimálnímu zamíchání (1 minuta při 1000 rpm).
12. Čteme (během 15 minut po posledním kroku) při absorbanci 450 nm.

3.5.3 β - Amyloid

Příprava reagensí

- Příprava 1500 µl 2000 pg/ml β - amyloid₍₁₋₄₂₎ standardu:
 - koncentrace koncentrovaného β - amyloid₍₁₋₄₂₎ standardu je 99600 pg/ml

$$X = \frac{1500 \times 2000}{99600} = 30 \mu\text{l} \text{ (viz. Tab.7)}$$

Tab. 7 Ředění standardu pro Aβ.

c (pg/ml)	Standard (µl)	Sample Diluent (µl)
2000=>A	30 µl	1470
1500=>B	150 µl z A	50
1000=>C	200 µl z A	200
500=>D	200 µl z C	200
250=>E	200 µl z D	200
125=>F	200 µl z E	200

- Příprava pracovních roztoků

Conjugate working solution 1 (konjugační pracovní roztok 1) ředíme 100x:

10 ml Conjugate Diluent 1 + **100 µl** Conjugate 1

Conjugate working solution 2 (konjugační pracovní roztok 2) ředíme 100x:

12 ml Conjugate Diluent 2 + **120 µl** Conjugate 2

Substrate working solution (pracovní roztok substrátu) ředíme 100x:

12 ml Substrate Buffer + **120 µl** Substrate TMB

Wash solution (mycí roztok) ředíme 25x:

30 ml Wash solution + **720 ml** destilované vody

Pracovní návod:

Připravíme si mikrotitrační destičku s potřebným množstvím jamek (48 jamek).

1. Pipetujeme **75 µl** konjugačního pracovního roztoku 1 do každé jamky.
2. Pipetujeme **25 µl** standardu (6 standardů) a **25 µl** blanku = sample diluentu v dupletu, **25 µl** vzorku (34 vzorků, jamky 2G - 6H). Zamícháme pomocí třepačky 1 minutu při 1000 rpm.

Tab. 8 Pipetování standardu a blanku.

St.	standard A		standard B		standard C		standard D		standard E		standard F		blank	
	1A	1B	1C	1D	1E	1F	1G	1H	2A	2B	2C	2D	2E	2F
jamky														

3. Zakryjeme adhezivním pečetidlem a inkubujeme 1 hodinu při pokojové teplotě (18 - 30°C) **ve tmě**.
4. Promyjeme 5 x **400 µl** Wash Solution.
5. Pipetujeme **100 µl** konjugačního pracovního roztoku 2 do každé jamky.
6. Zakryjeme adhezivním pečetidlem a inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě **ve tmě**.
7. Promyjeme 5 x **400 µl** Wash Solution.
8. Pipetujeme **100 µl** Substrate Working Solution do každé jamky.
9. Inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě (18 – 30°C) **ve tmě**.
10. Pipetujeme **50 µl** Stop Solution do každé jamky ve stejném pořadí a ve stejném časovém intervalu jako Substrate Working Solution.

11. Bezpečně upevníme stripholder k optimálnímu zamíchání (1 minuta při 1000 rpm) .
12. Čteme (během 15 minut po posledním kroku) při absorbanci 450 nm.

3.6 Verifikace metody

Verifikace (ověření) je poskytnutí objektivního důkazu, že daná položka splňuje specifikované požadavky. Tedy potvrzení, že jsou dosaženy požadované analytické znaky deklarovaná výrobcem.

Před uvedením metody do rutinního laboratorního provozu je potřeba provést verifikaci. Ve všech 3 případech se jedná o kvantitativní stanovení. Jako základní verifikační parametry byly vybrány:

opakovatelnost v sérii – byly vybrány standardy z kalibrační křivky, které byly opakovaně naměřeny v jedné sérii. Pro každý marker byly vybrány 2 standardy: pro β - AMYLOID a PHOSPHO - TAU standardy B a E; pro TAU protein standardy B a D.

Tab. 9 Pipetování standardů pro opakovatelnost u β - AMYLOIDU, PHOSPHO - TAU a TAU protein.

TAU protein	standard B					standard D				
jamky	1C	1D	2E	2F	2G	1G	1H	2H	3A	3B
β - AMYLOID	standard B					standard E				
jamky	1C	1D	2G	2H	3A	2A	2B	3B	3C	3D
PHOSPHO - TAU	standard B					standard E				
jamky	1C	1D	2G	2H	3A	2A	2B	3B	3C	3D

mezilehlá přesnost – ověření bylo provedeno vyhodnocením výsledků parametrů standardní křivky naměřených v oddělených sériích. Z každého měření byly vybrány dva standardy: pro β - AMYLOID a PHOSPHO - TAU standardy B a E; pro TAU protein standardy B a D.

dolní rozsah metody – vyhodnocením naměřených hodnot blanku (Sample diluent).

LOD = průměrný blank + 2xS

4 Výsledky

4.1 Verifikace

Pro ověření metody byly použity parametry: opakovatelnost v sérii, mezilehlá přesnost a dolní rozsah metody. Pomocí funkcí v programu excel byly pro každý parametr vypočítány hodnoty - směrodatná odchylka (smodch.výběr) a průměr. Variační koeficient (CV) a limit detekce (LOD) byly vypočteny pomocí vzorce

$$\Rightarrow CV = \frac{s \text{ mod } ch}{prumer} \times 100; \quad LOD = prumer + 2 * s \text{ mod } ch.$$

- opakovatelnost v sérii

Tab. 10 Vybrané standardy měřené v jedné sérii v 5 - ti opakováních.

standardy	tau protein(OD)		β amyloid(OD)		p-tau(OD)	
	ST.B	ST.D	ST.B	ST.E	ST.B	ST.E
1.	1,11	0,19	1,92	0,52	1,34	0,07
2.	1,13	0,2	1,93	0,48	1,28	0,07
3.	0,97	0,24	2,01	0,47	1,25	0,05
4.	1,12	0,2	2,05	0,41	1,32	0,07
5.	1,13	0,18	1,98	0,48	1,26	0,07
průměr	1,09	0,2	1,98	0,48	1,29	0,07
smodch	0,07	0,02	0,05	0,04	0,04	0,01
CV (%)	6,15	11,07	2,71	8,19	3,16	11,49

Variační koeficient má na základě doporučení výrobce nabývat pro opakovatelnost hodnot menších než 15%. Z výsledků vyplývá, že podmínka opakovatelnosti byla splněna.

- mezilehlá přesnost

Tab. 11 Vybrané standardy z měření.

standardy	tau protein(OD)		β amyloid(OD)		p - tau(OD)	
	ST.B	ST.D	ST.B	ST.E	ST.B	ST.E
1.	1,11	0,19	1,92	0,52	1,34	0,07
2.	1,13	0,2	1,93	0,48	1,28	0,07
3.	0,97	0,24	2,01	0,47	1,25	0,05
4.	1,12	0,21	2,05	0,41	1,32	0,07
5.	1,13	0,18	1,98	0,48	1,26	0,07
6.	1,37	0,28	2,14	0,58	1,8	0,05
7.	1,25	0,26	2,12	0,49	1,79	0,08
smodch	0,12	0,04	0,09	0,05	0,25	0,01
průměr	1,15	0,22	2,02	0,49	1,43	0,07
CV (%)	11	17	4	10	17	13

Pro výpočet variačního koeficientu byly vyloučeny statisticky odlehle hodnoty. Variační koeficient pro mezilehlou přesnost má na základě doporučení odborné společnosti pro tento typ metody dosahovat hodnoty maximálně 20%. Z výsledků vyplývá, že podmínka mezilehlé přesnosti byla splněna.

- dolní rozsah metody

Tab. 12 Vyhodnocení dolního rozsahu metody – hodnoty blanků z každého měření.

markery	TAU protein	β - AMYLOID	PHOSPHO - TAU
1.měření	0,06	0,06	0,05
2.měření	0,12	0,06	0,05
3.měření	0,13	0,05	0,06
4.měření	0,09	0,05	0,05
průměr	0,1	0,06	0,05
smodch	0,03	0,006	0,005
LOD	0,15	0,07	0,06

Limit detekce splňuje výrobcem deklarované podmínky.

TAU protein: blank<0,200

A β : blank<0,100

PHOSPHO - TAU: blank<0,100

Z naměřených verifikačních dat vyplývá, že všechny parametry byly splněny. Soupravy jsou vhodné pro měření.

4.2 Výsledky pacientů

Analyzátor měří hodnotu absorbance v každé jamce. Pro každé měření se vyhodnocuje nová standardní křivka, která má zadané rozmezí hodnot (pro každý marker jiné). Na základě hodnot koncentrací a absorbancí bodů standardní křivky analyzátor vyhodnotí koncentrace všech vzorků.

4.2.1 Vyhodnocovací kritéria

Patologické hodnoty vyšetřovaných proteinů (vyhodnocení dle literatury)

- kritéria byla převzata z článku Praktické zkušenosti s laboratorní diagnostikou Alzheimerovy nemoci pomocí tau proteinu, phospho - tau proteinu a β - amyloidu v likvoru. (Koudelková M., 2009)

- **H - tau**

21 – 50 let	> 300 pg/ml
51 – 70 let	> 450 pg/ml
71 – 93 let	> 500 pg/ml
- **p - tau** > 60 pg/ml

- β – amyloid < 500 pg/ml

Patologické hodnoty vyšetřovaných proteinů (2.kritéria vyhodnocení) – kritéria deklarovaná výrobcem

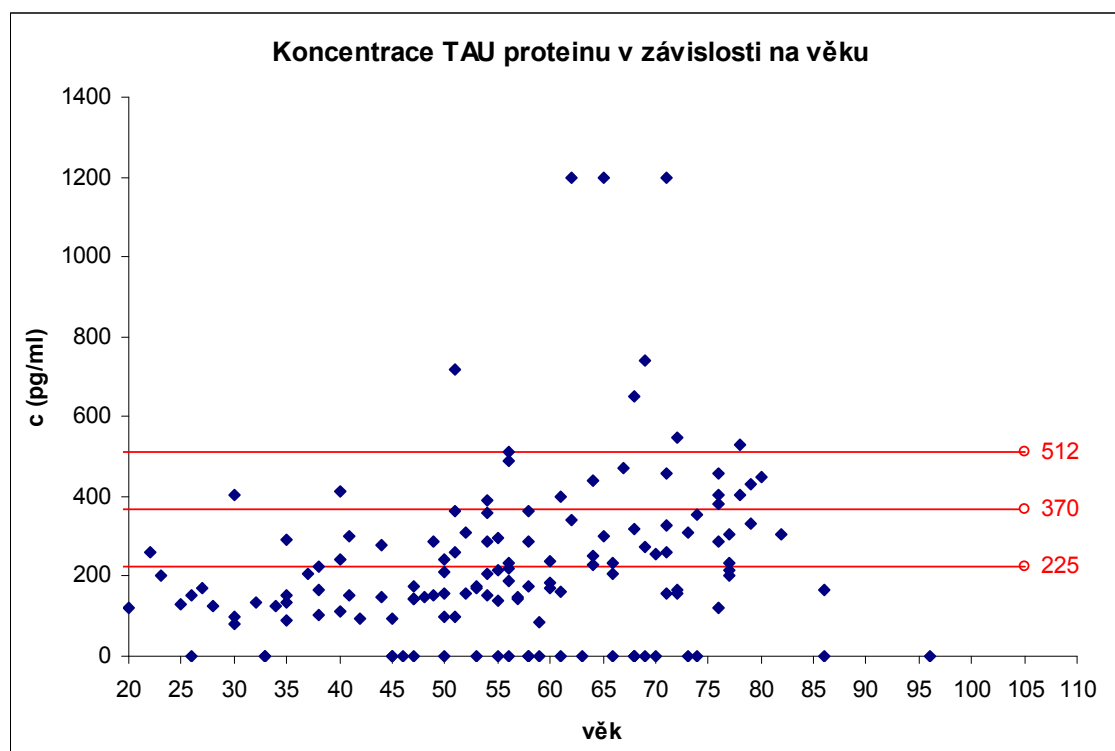
- **H - tau**
 - 21 – 51 let > 225 pg/ml
 - 51 – 71 let > 370 pg/ml
 - >71 let > 512 pg/ml
- **p - tau**
 - 18 - 44 let > 66,26 pg/ml
 - 45 - 77 let > 45,67 pg/ml
- **β – amyloid**
 - 21 - 51 let < 616 pg/ml
 - 51 - 71 let < 562 pg/ml
 - >71 let < 567 pg/ml

Tab. 13 Výsledky všech měření TAU proteinu – všechny naměřené hodnoty TAU proteinu vyhodnocené dle obou kritérií. Červeně jsou znázorněny pozitivní hodnoty vyhodnocené dle kritérií z literatury a modré dle kritérií od výrobce. Obě barvy pak znázorňují, že pozitivita byla vyhodnocena na základě obou kritérií.

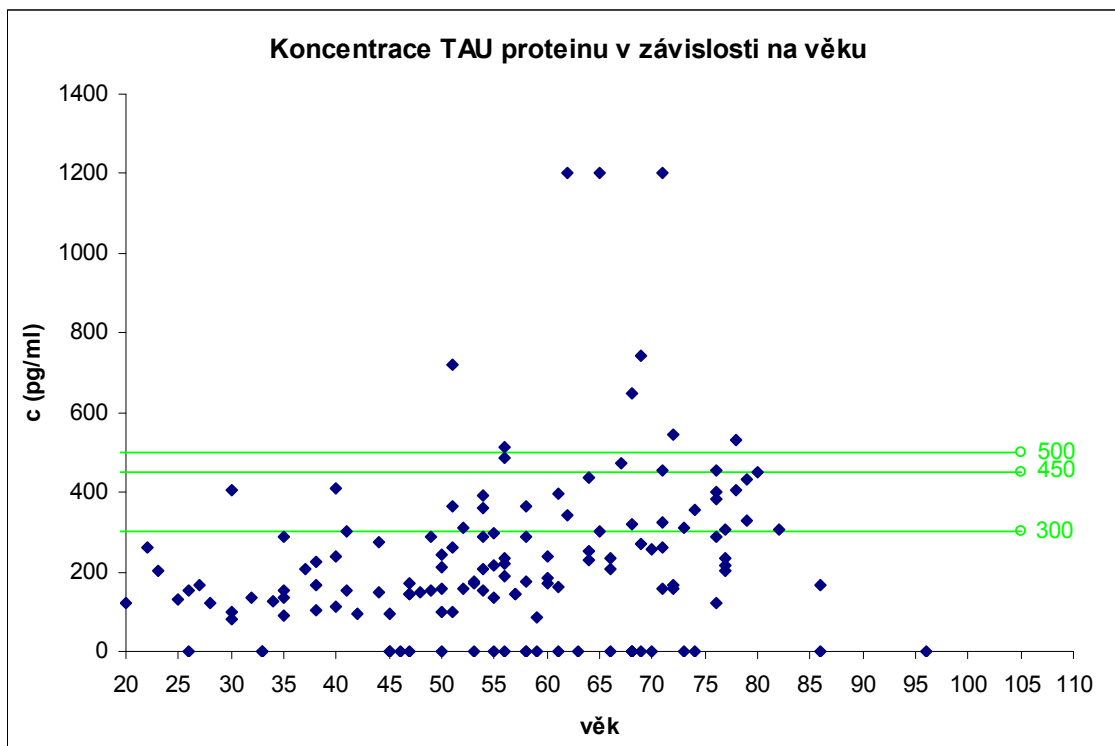
	1.měření		2.měření		3.měření		4.měření	
	věk	TAU (pg/ml)	věk	TAU (pg/ml)	věk	TAU (pg/ml)	věk	TAU (pg/ml)
1.	78	405	60	170,68	62	1200	71	156,68
2.	51	261	56	232,22	67	470,59	42	92,96
3.	30	99,98	66	235,02	68	P.m.d.	65	1200
4.	51	364	56	0	79	431,51	62	340,83
5.	59	86,5	52	309,51	40	111,02	57	145,71
6.	52	158,5	49	287,84	56	189,63	58	174,31
7.	28	123,5	54	154,69	40	240,43	44	276,37
8.	26	154	82	304,73	20	119,85	72	545,53
9.	35	135,6	86	0	70	257,9	76	401,81
10.	71	456,6	77	215,8	50	213,05	64	228,01
11.	72	167,7	77	235,02	59	0	46	0
12.	50	156	54	286,61	56	220,02	68	648,66
13.	66	205,09	80	447,94	86	166,62	58	286,89
14.	45	95,6	77	306,33	22	261,41	44	146,59
15.	60	186	76	456,15	77	200,92	65	301,05
16.	34	124,5	79	330,85	25	131,85	54	390,99
17.	33	P.m.d.	47	0	55	297,27	47	143,05
18.	74	P.m.d.	64	252,11	76	287,66	38	101,36
19.	58	365,3	74	353,72	71	325,53	54	206,61
20.	35	88	76	382,09	51	718,5	78	531,41
21.	33	P.m.d.	73	0	73	309,63	71	260,17
22.	61	163	53	171,98	56	512,26	47	145,71
23.	40	411	63	P.m.d.	61	397,89	60	236,59

24.	50	242,7	70	P.m.d.	30	82,36	53	176,86
25.	45	P.m.d.	68	P.m.d.	32	135,29	41	151,43
26.	53	P.m.d.	58	P.m.d.	27	168,32	64	437,61
27.	37	207	66	P.m.d.	71	1200	48	146,59
28.	49	151	69	P.m.d.	55	216,53	41	302,67
29.	55	P.m.d.	61	P.m.d.	56	488,02	23	203,71
30.	72	158	68	P.m.d.	57	146,19	35	289,72
31.	68	319,5		Standard	55	137,13	38	226,37
32.	58	P.m.d.		Standard	51	100,88	30	405,57
33.	76	121		Standard	26	0	69	741,24
34.	50	P.m.d.		Standard	35	154,02	47	173,03
35.	96	P.m.d.		Standard	45	0	69	272,32
36.	50	97		Standard	38	165,89	54	360,87

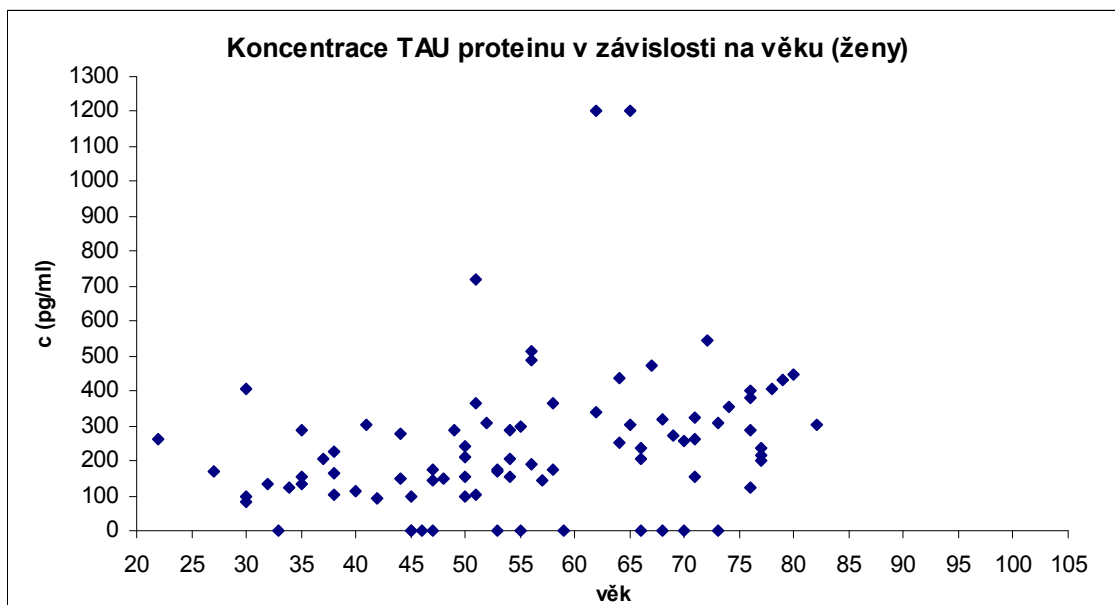
Z tabulky č.13 vyplývá, že jsme detekovali celkem 27 pozitivních pacientů, z toho 17 žen a 10 mužů. Pomocí kritérií dle výrobce: 27 pozitivních, z toho 17 žen a 10 mužů. Dle kritérií z literatury: 14 pozitivních pacientů, z toho 9 žen a 5 mužů. Shoda kritérií nastala ve 14 - ti případech.



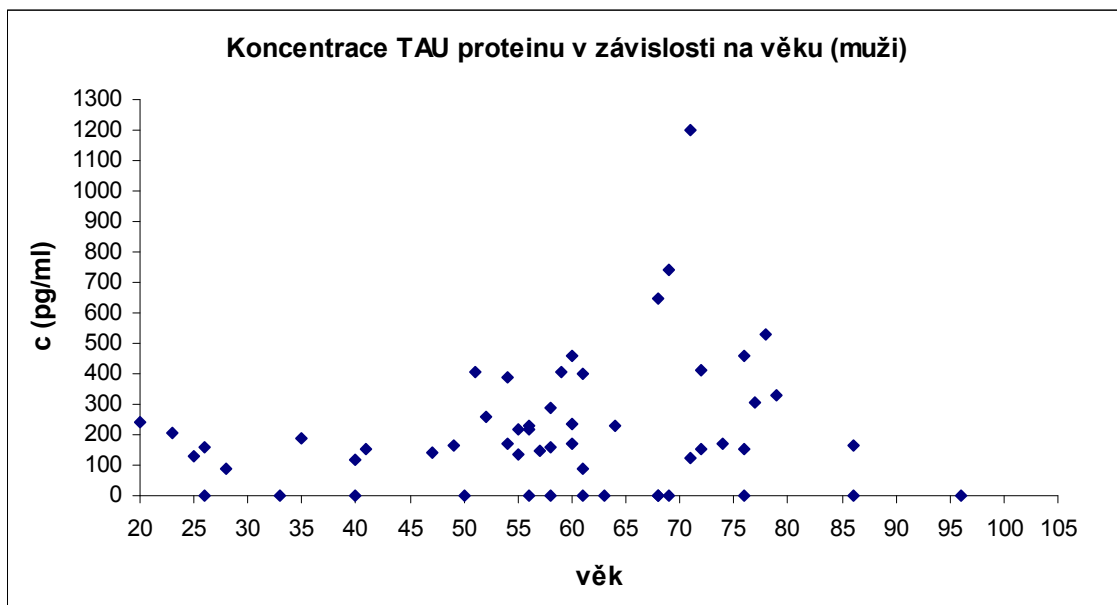
Obr. 6 Graf závislosti koncentrace TAU proteinu na věku (obě pohlaví) + hraniční hodnoty pro TAU protein – kritéria dle výrobce. Kritéria jsou závislá na věku: vzorky jsou pozitivní pokud překročí vyznačené hranice. Hodnoty nad 225 pg/ml (21 - 51let); hodnoty nad 370 pg/ml (51 - 71let); hodnoty nad 512 pg/ml (více jak 71let)



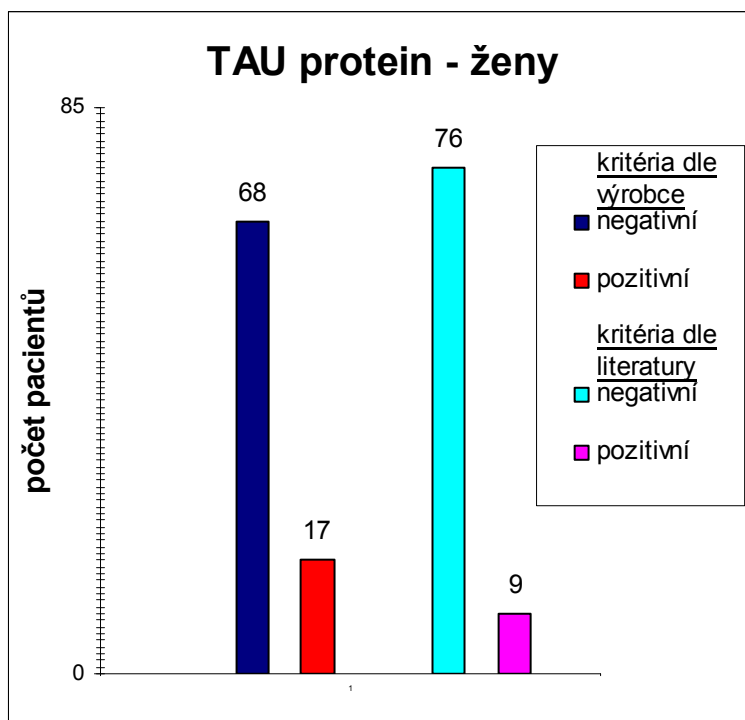
Obr. 7 Graf závislosti koncentrace TAU proteinu na věku (obě pohlaví) + hraniční hodnoty pro TAU protein – kritéria dle literatury. Kritéria jsou závislá na věku: vzorky jsou pozitivní pokud překročí vyznačené hranice. Hodnoty nad 300 pg/ml (21 - 50let); hodnoty nad 450 pg/ml (51 - 70let); hodnoty nad 500 pg/ml (71-93let)



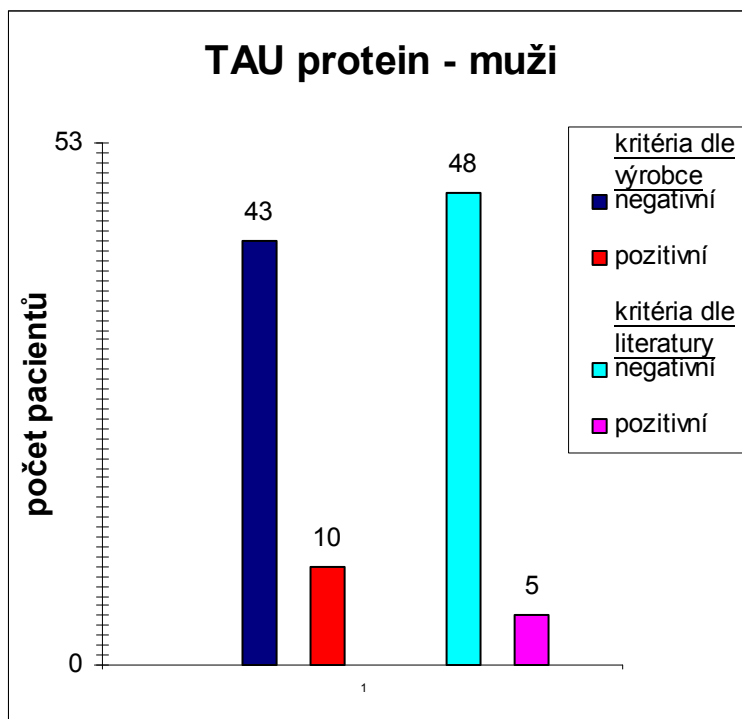
Obr. 8 Graf závislosti koncentrace TAU proteinu s věkem u žen.



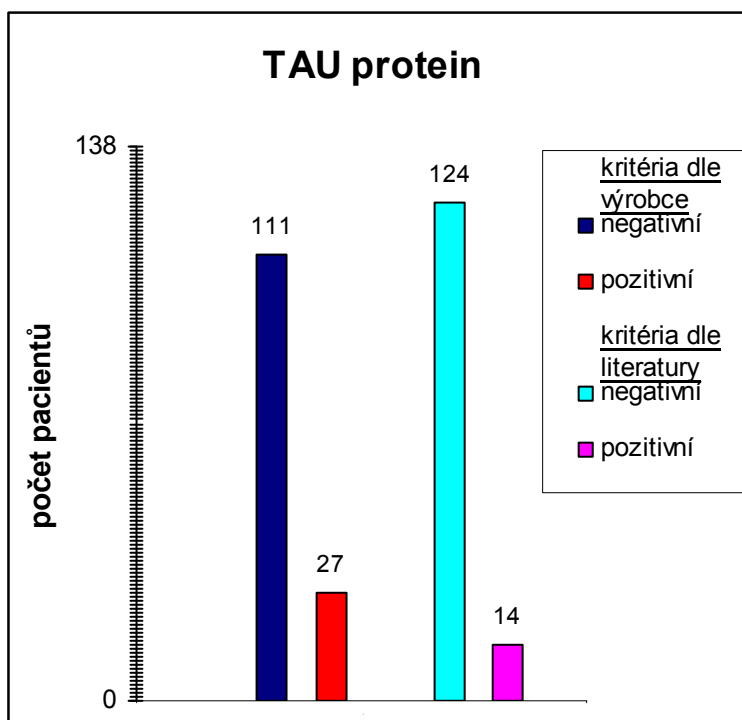
Obr. 9 Graf závislosti koncentrace TAU proteinu s věkem u mužů.



Obr. 10 Vyhodnocení četnosti pozitivních a negativních hodnot TAU - proteinu u žen na základě obou kritérií. Z grafu vyplývá, že z celkového počtu 85 žen bylo na základě kritérií dle výrobce určeno 17 pozitivních a 68 negativních žen. Na základě kritérií dle literatury bylo určeno 9 pozitivních a 76 negativních žen.



Obr. 11 Vyhodnocení četnosti pozitivních a negativních hodnot TAU - proteinu u mužů na základě obou kritérií. Z grafu vyplývá, že z celkového počtu 53 mužů bylo na základě kritérií dle výrobce určeno 10 pozitivních a 43 negativních mužů. Na základě kritérií dle literatury bylo určeno 5 pozitivních a 48 negativních mužů.



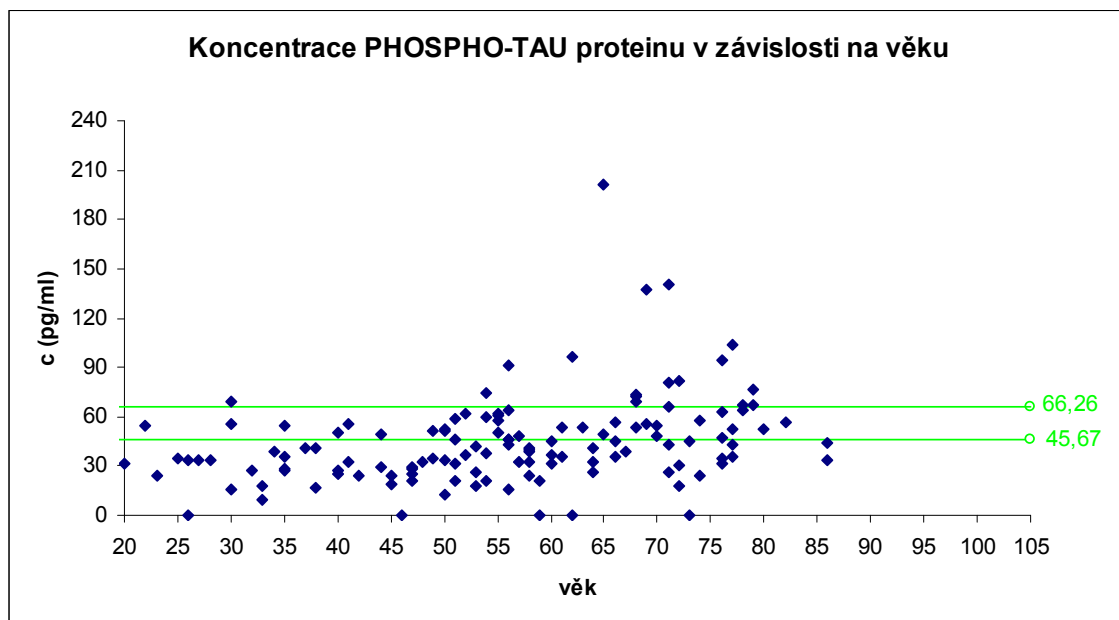
Obr. 12 Vyhodnocení četnosti pozitivních a negativních hodnot TAU - proteinu na základě obou kritérií (obě pohlaví). Z grafu vyplývá, že z celkového počtu 138 pacientů

bylo na základě kritérií dle výrobce určeno 27 pozitivních a 111 negativních pacientů. Na základě kritérií dle literatury bylo určeno 14 pozitivních a 124 negativních pacientů.

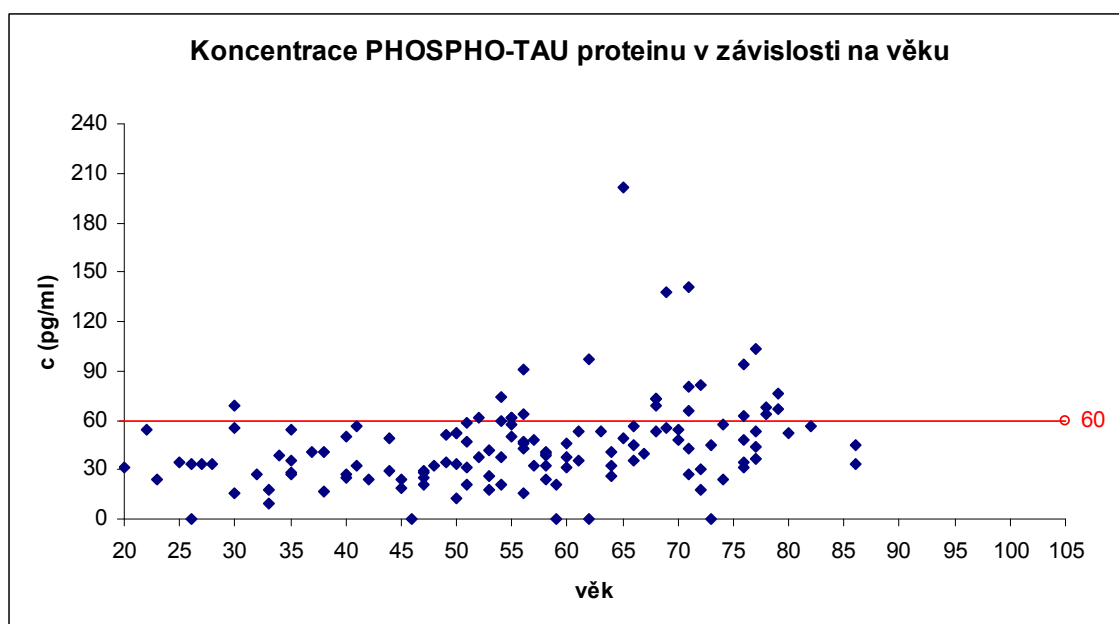
Tab. 14 Výsledky všech měření PHOSPHO - TAU proteinu – všechny naměřené hodnoty PHOSPHO - TAU proteinu vyhodnocené dle obou kritérií. Červeně jsou znázorněny pozitivní hodnoty vyhodnocené dle literatury a modře pozitivní hodnoty vyhodnocené dle výrobce. Obě barvy představují, že pozitivita byla vyhodnocena oběma kritérii.

	1.měření		2.měření		3.měření		4.měření	
	věk	P-TAU (pg/ml)	věk	P-TAU (pg/ml)	věk	P-TAU (pg/ml)	věk	P-TAU (pg/ml)
1.	78	67,56	60	31,14	62	96,9	71	26,67
2.	51	46,53	56	46,49	67	39,29	42	24,01
3.	30	55,64	66	44,74	68	73,3	65	201,2
4.	51	31,55	56	15,9	79	76,21	62	-
5.	59	20,47	52	62,03	40	25,5	57	32,22
6.	52	37,18	49	51,51	56	42,54	58	32,61
7.	28	33,38	54	20,65	40	49,9	44	49,1
8.	26	33,26	82	56,22	20	31,66	72	81,27
9.	35	35,67	86	44,38	70	54,11	76	34,87
10.	71	65,91	77	36,07	50	51,73	64	41,14
11.	72	30,26	77	103,32	59	0	46	0
12.	50	33,15	54	59,39	56	46,02	68	53,47
13.	66	36	80	52,63	86	33,59	58	40,83
14.	45	23,85	77	52,79	22	54,72	44	29,27
15.	60	37,18	76	93,8	77	43,31	65	49,35
16.	34	38,64	79	67,03	25	34,43	54	74
17.	33	17,8	47	21	55	61,29	47	25,11
18.	74	24,02	64	25,68	76	62,46	38	17,05
19.	58	39,55	74	57,74	71	80,28	54	37,49
20.	35	27,78	76	47,53	51	58,8	78	63,47
21.	33	9,43	73	0	73	44,68	71	42,76
22.	61	35,78	53	26,25	56	90,67	47	29,71
23.	40	26,75	63	53,42	61	53,71	60	45,43
24.	50	52,54	70	47,87	30	16,06	53	42,18
25.	45	18,74	68	72,69	32	27,31	41	32,02
26.	53	17,3	58	38,73	27	33,76	64	32,22
27.	37	41,21	66	56,68	71	140,82	48	32,02
28.	49	34,43	69	137,75	55	61,47	41	55,87
29.	55	P.m.d.		Standard	56	63,79	23	24,01
30.	72	17,3		Standard	57	47,77	35	54,51
31.	68	69,07		Standard	55	50,12	38	40,68
32.	58	24,19		Standard	51	20,99	30	69,23
33.	76	31,17		Standard	26	0	69	55,65
34.	50	12,11		Standard	35	26,87	47	28,36

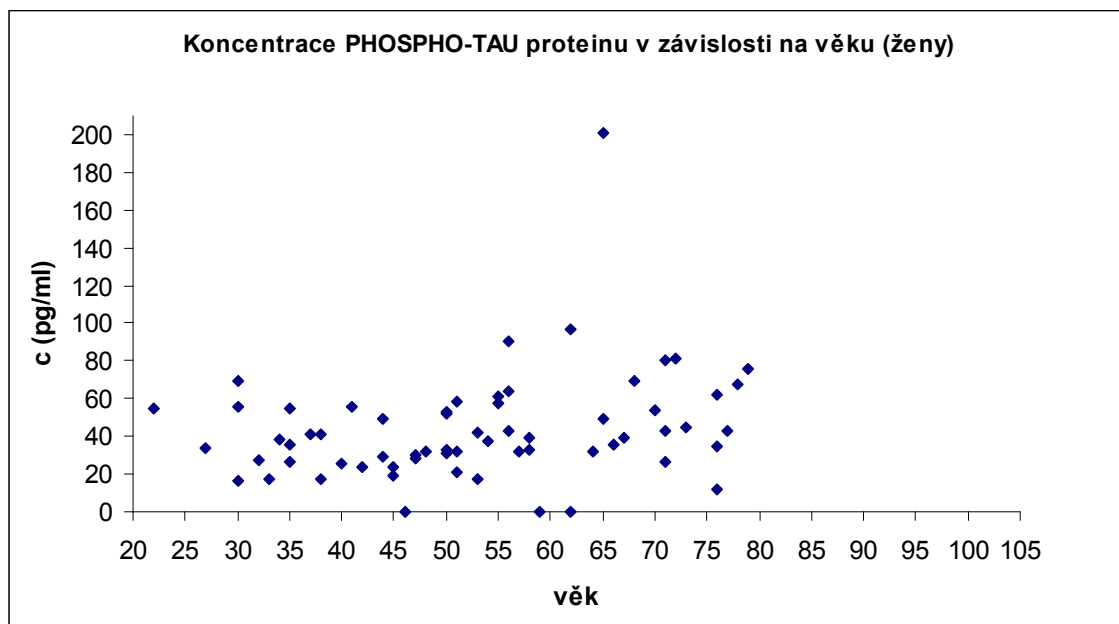
Z tabulky č.14 vyplývá, že jsme detekovali celkem 31 pozitivních pacientů, z toho 20 žen a 11 mužů. Pomocí kritérií dle výrobce: 24 pozitivních pacientů, z toho 15 žen a 9 mužů. Kritéria z literatury: 25 pozitivních pacientů, z toho 15 žen a 10 mužů. Shoda kritérií nastala v 18 - ti případech.



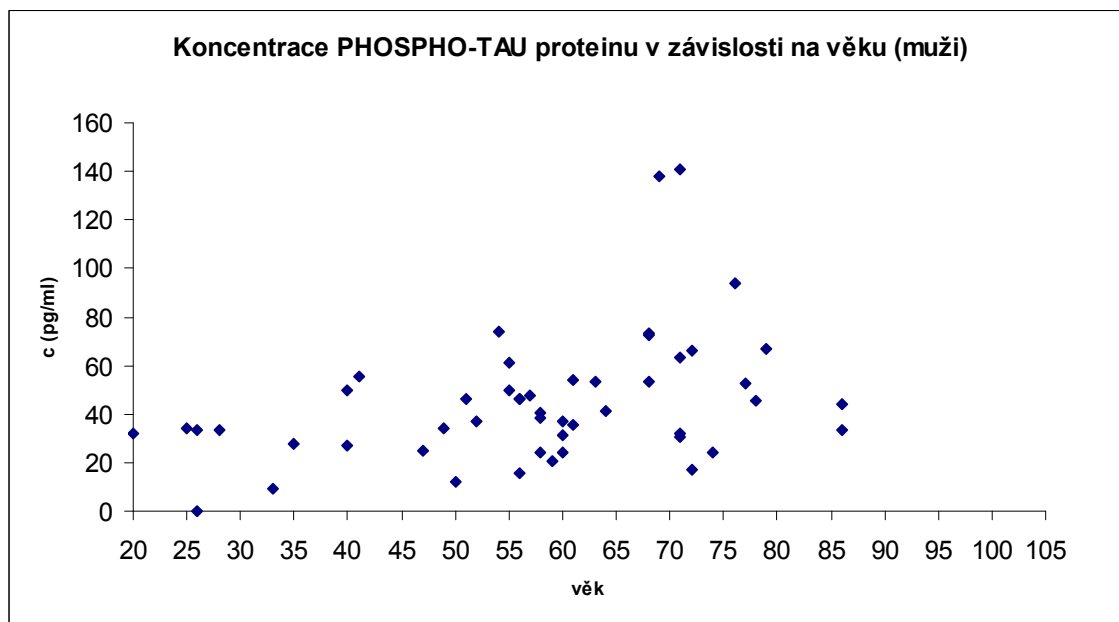
Obr. 13 Graf závislosti koncentrace PHOSPHO - TAU proteinu na věku (obě pohlaví) + hraniční hodnoty pro PHOSPHO - TAU protein – kritéria dle výrobce. Kritéria jsou závislá na věku: vzorky jsou pozitivní pokud překročí vyznačené hranice. Hodnoty nad 45,67 pg/ml (18 - 44let); hodnoty nad 66,26 pg/ml (45 - 77let).



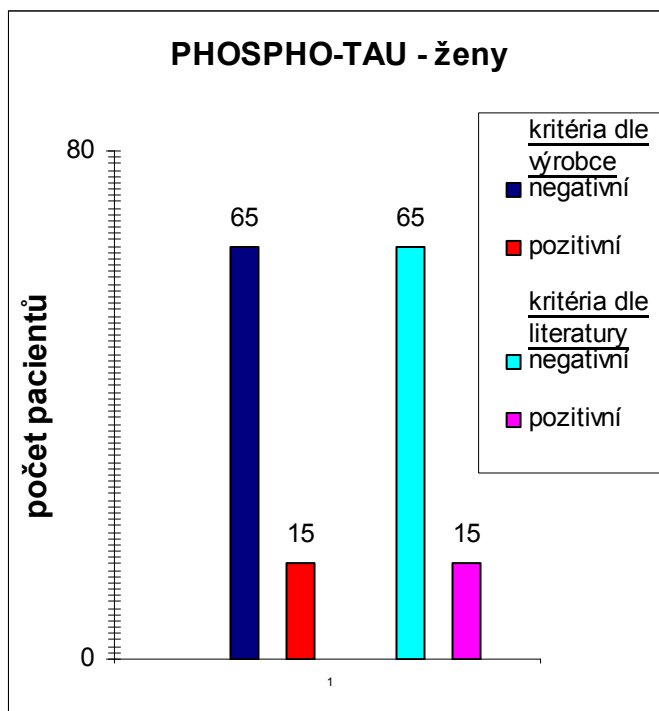
Obr. 14 Graf hodnot koncentrací PHOSPHO - TAU proteinu (obě pohlaví) + hraniční hodnoty pro PHOSPHO -TAU protein – kritéria dle literatury. Kritérium není závislé na věku: vzorky jsou pozitivní pokud překročí vyznačené hranice. Hodnoty nad 60 pg/ml jsou pozitivní.



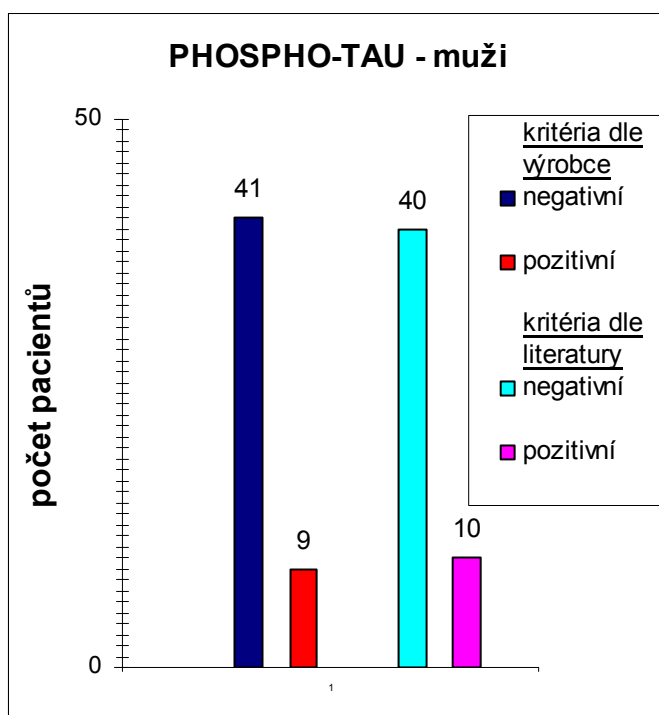
Obr. 15 Graf závislosti koncentrace PHOSPHO - TAU proteinu s věkem u žen.



Obr. 16 Graf závislosti koncentrace PHOSPHO - TAU proteinu s věkem u mužů.

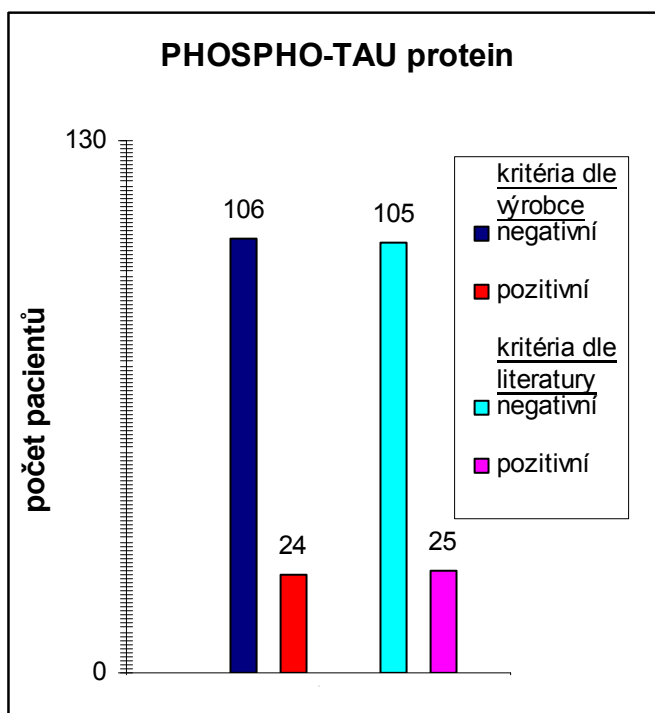


Obr. 17 Vyhodnocení četnosti pozitivních a negativních hodnot PHOSPHO - TAU proteinu u žen na základě obou kritérií. Z grafu vyplývá, že z celkového počtu 80 žen bylo na základě kritérií dle výrobce určeno 15 pozitivních a 65 negativních žen. Na základě kritérií dle literatury bylo určeno 15 pozitivních a 65 negativních žen.



Obr. 18 Vyhodnocení četnosti pozitivních a negativních hodnot PHOSPHO - TAU proteinu u mužů na základě obou kritérií. Z grafu vyplývá, že z celkového počtu 50

mužů bylo na základě kritérií dle výrobce určeno 9 pozitivních a 41 negativních mužů. Na základě kritérií dle literatury bylo určeno 10 pozitivních a 40 negativních mužů.



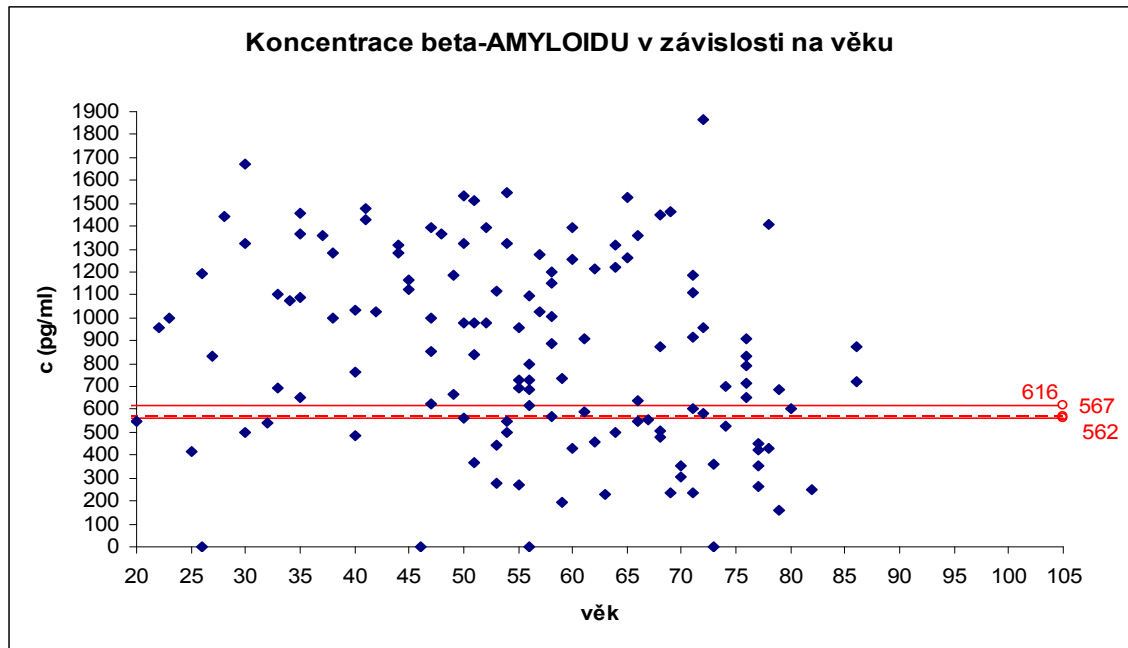
Obr. 19 Vyhodnocení četnosti pozitivních a negativních hodnot PHOSPHO - TAU proteinu na základě obou kritérií (obě pohlaví). Z grafu vyplývá, že z celkového počtu 130 pacientů bylo na základě kritérií dle výrobce určeno 24 pozitivních a 106 negativních pacientů. Na základě kritérií dle literatury bylo určeno 25 pozitivních a 105 negativních pacientů.

Tab. 15 Výsledky všech měření β - AMYLOIDU – všechny naměřené hodnoty β -AMYLOIDU vyhodnoceny dle obou kritérií. Červeně jsou znázorněny pozitivní hodnoty vyhodnocené dle literatury a modře pozitivní hodnoty vyhodnocené dle výrobce. Obě barvy představují, že pozitivita byla vyhodnocena oběma kritérii.

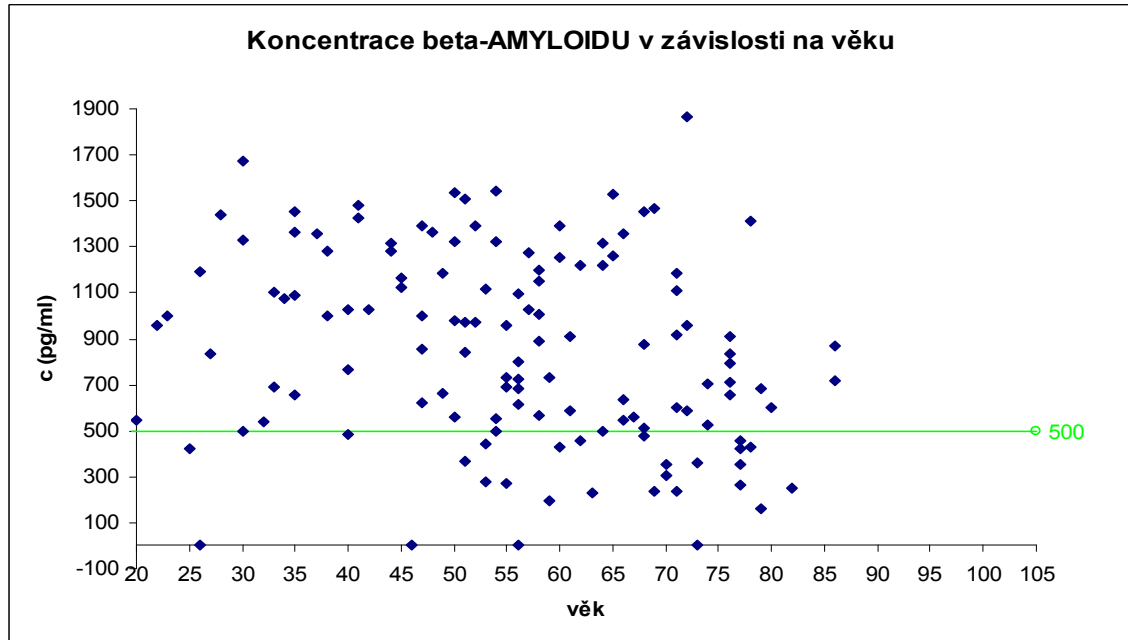
	1.měření		2.měření		3.měření		4.měření	
	věk	A β (pg/ml)	věk	A β (pg/ml)	věk	A β (pg/ml)	věk	A β (pg/ml)
1.	78	1410,13	60	429,31	62	460,09	71	600,79
2.	51	1509,11	56	725,48	67	557,14	42	1025,63
3.	30	1326,73	66	548,81	68	480,24	65	1525,49
4.	51	840,55	56	00	79	158,3	62	1216,25
5.	59	732,24	52	974,62	40	486,89	57	1275,82
6.	52	1393,01	49	664	56	797,75	58	1199,83
7.	28	1439	54	496,76	40	764,28	44	1280,7
8.	26	1190,22	82	248,27	20	544,52	72	1866,88

9.	35	1367,29	86	871,45	70	355,17	76	652,58
10.	71	1112,87	77	353,13	50	978,77	64	1220,86
11.	72	959,09	77	265,27	59	194,14	46	0,0
12.	50	1323,92	54	551,1	56	685,81	68	1450,76
13.	66	1359,89	80	604,4	86	717,78	58	1152
14.	45	1166,99	77	421,63	22	958,44	44	1317,54
15.	60	1255,42	76	710,94	77	453,82	65	1261,33
16.	34	1075,37	79	684,85	25	418,98	54	1545,76
17.	33	1101,22	47	622,43	55	958,44	47	855,24
18.	74	701,26	64	500,3	76	911,2	38	997,85
19.	58	1003,44	74	525,47	71	915,71	54	1321,6
20.	35	1090,78	76	832,22	51	974,89	78	430,62
21.	33	692,44	73	0	73	363,56	71	1183,65
22.	61	911,09	53	441,09	56	1092,47	47	1001,68
23.	40	1029,91	63	228,89	61	586,19	60	1391,14
24.	50	1532,75	70	303,52	30	500,92	53	1118,7
25.	45	1121,45	68	509,04	32	539,77	41	1426,7
26.	53	276,14	58	566,32	27	833,07	64	1316,52
27.	37	1358,42	66	635,6	71	238,18	48	1364,22
28.	49	1184,35	69	235,21	55	692,56	41	1480,2
29.	55	P.m.d.		Standard	56	614,58	23	998,62
30.	72	583,91		Standard	57	1026,53	35	1453,08
31.	68	875,94		Standard	55	730,98	38	1284,62
32.	58	889,68		Standard	51	364,54	30	1671,45
33.	76	790,87		Standard	26	0	69	1464,78
34.	50	559,79		Standard	35	653,61	47	1393,32

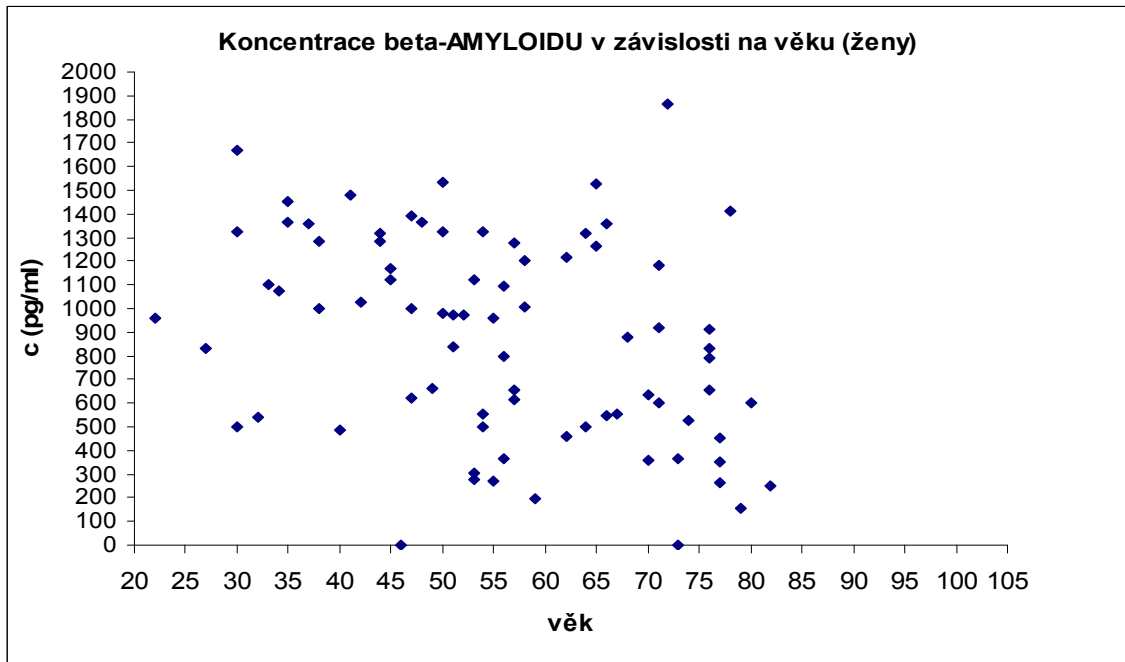
Z tabulky č.15 vyplývá, že jsme detekovali celkem 37 pozitivních pacientů, z toho 24 žen a 13 mužů. Pomocí kritérií dle výrobce: 37 pozitivních pacientů, z toho 24 žen a 13 mužů. Kritéria z literatury: 29 pozitivních pacientů, z toho 19 žen a 10 mužů. Shoda kritérií nastala v 29 - ti případech.



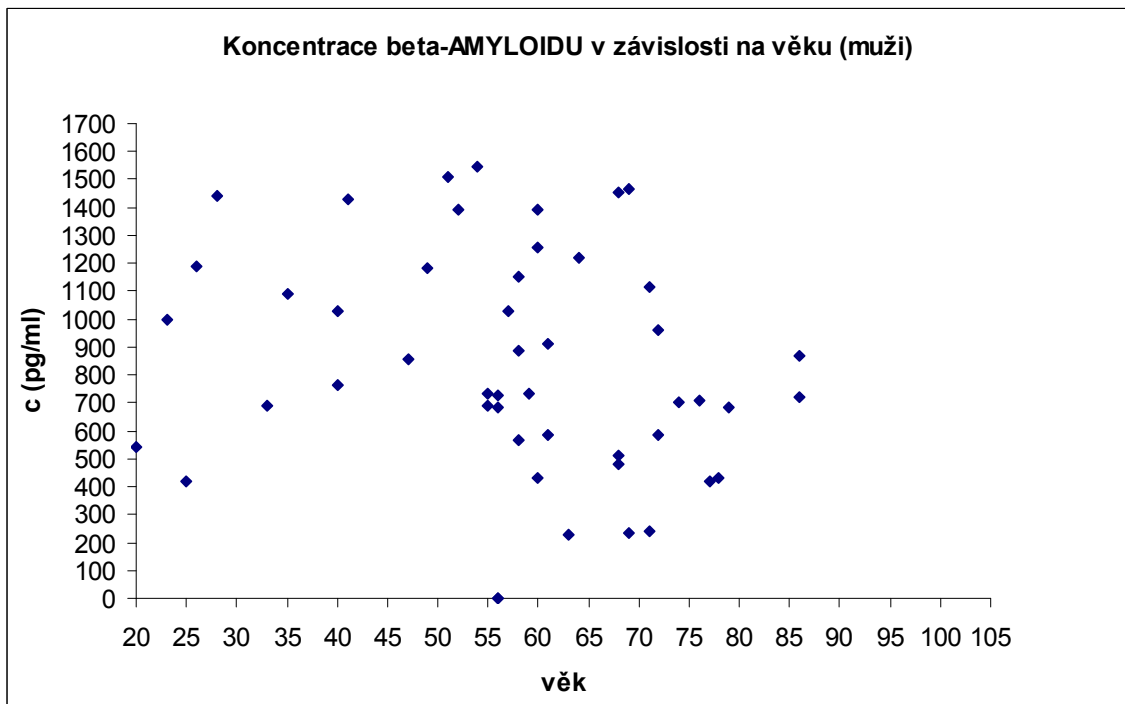
Obr. 20 Graf závislosti ↓ koncentrace β - AMYLOIDU na věku (obě pohlaví) + hraniční hodnoty pro β - AMYLOID – kritéria dle výrobce. Kritéria jsou závislá na věku: vzorky jsou pozitivní pokud se nacházejí pod vyznačenými hranicemi. Hodnoty pod 616 pg/ml (21 - 51let); hodnoty pod 562pg/ml (51 - 70let); hodnoty pod 567 pg/ml (více jak 71let)



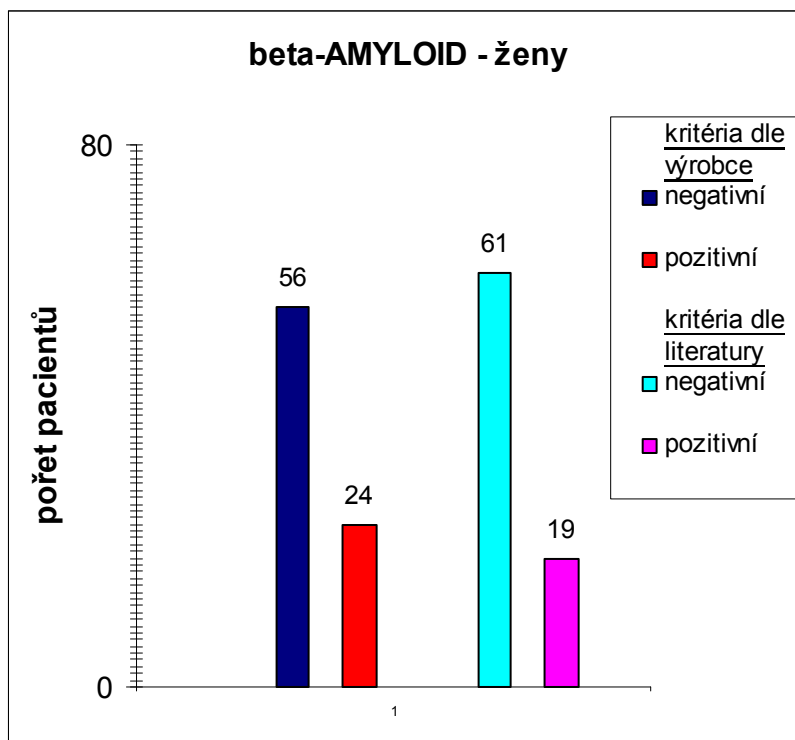
Obr. 21 Graf hodnot ↓ koncentrací β - AMYLOIDU (obě pohlaví) + hraniční hodnoty pro β - AMYLOID – kritéria dle literatury. Kritérium není závislé na věku: vzorky jsou pozitivní pokud se nacházejí pod vyznačenou hranicí. Hodnoty pod 500 pg/ml jsou pozitivní.



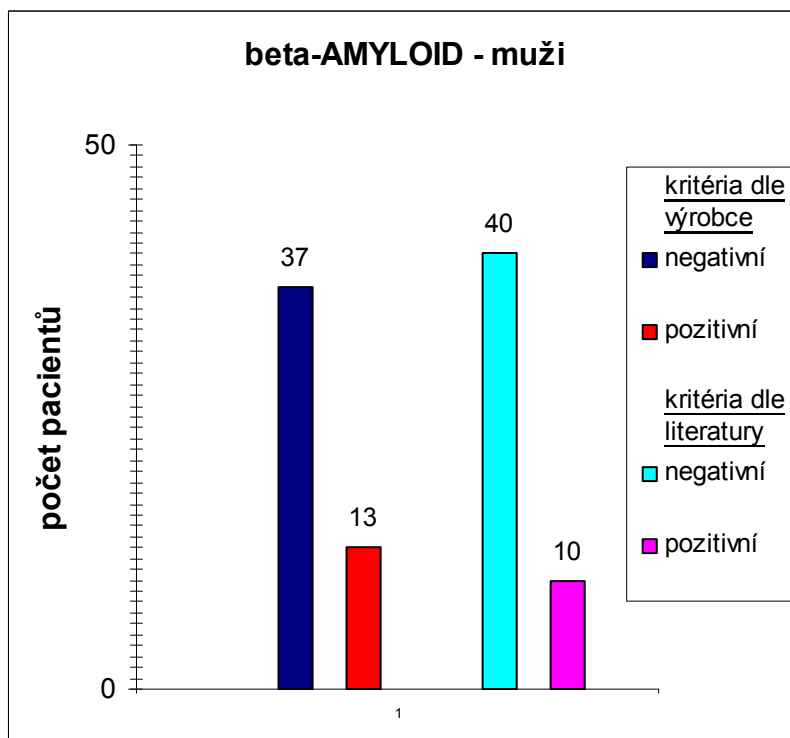
Obr. 22 Graf závislosti koncentrace β - AMYLOIDU s věkem u žen.



Obr. 23 Graf závislosti koncentrace β - AMYLOIDU s věkem u mužů.

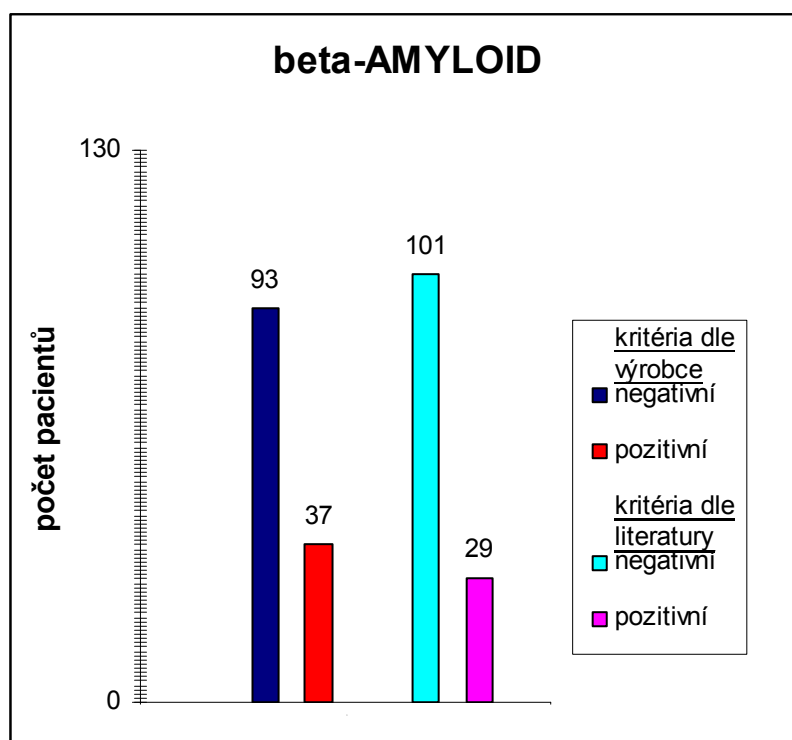


Obr. 24 Vyhodnocení četnosti pozitivních a negativních hodnot β – AMYLOIDU u žen na základě obou kritérií. Z grafu vyplývá, že z celkového počtu 80 žen bylo na základě kritérií dle výrobce určeno 24 pozitivních a 56 negativních žen. Na základě kritérií dle literatury bylo určeno 19 pozitivních a 61 negativních žen.



Obr. 25 Vyhodnocení četnosti pozitivních a negativních hodnot β – AMYLOIDU u mužů na základě obou kritérií. Z grafu vyplývá, že z celkového počtu 50 mužů bylo

na základě kritérií dle výrobce určeno 13 pozitivních a 37 negativních mužů. Na základě kritérií dle literatury bylo určeno 10 pozitivních a 40 negativních mužů.



Obr. 26 Vyhodnocení četnosti pozitivních a negativních hodnot β - AMYLOIDU na základě obou kritérií (obě pohlaví). Z grafu vyplývá, že z celkového počtu 130 pacientů bylo na základě kritérií dle výrobce určeno 37 pozitivních a 93 negativních mužů. Na základě kritérií dle literatury bylo určeno 29 pozitivních a 101 negativních pacientů.

4.2.2 Vyhodnocení tripletu markerů pro detekci Alzheimerovy choroby

V roce 2007 došlo k zařazení specifických AD biomarkerů mezi podpůrná diagnostická kritéria pro Alzheimerovu chorobu, v tomto znění: nízká koncentrace beta-amyloidu, zvýšená koncentrace H - tau proteinu nebo zvýšená koncentrace phospho - tau proteinu, nebo kombinace všech tří biomarkerů.(Dubois et al., 2007) Vyhodnocovací algoritmus je stejný pro obě popsání kritéria, pouze udané hodnoty koncentrací jednotlivých markerů jsou odlišné.

Pozitivní: \uparrow H - tau + \uparrow P - tau + \downarrow A β 42

\uparrow H - tau + \uparrow P - tau

\uparrow H - tau + \downarrow A β 42

\uparrow P - tau + \downarrow A β 42

Hraniční: \downarrow A β 42

\uparrow P - tau

Negativní: \uparrow H - tau

V tomto vyhodnocení byl použit likvor od 85 - ti žen a 53 mužů. Průměrný věk žen byl 56 let a mužů 57 let.

Tab. 16 První měření – změřeno bylo celkem 36 pacientů. Výsledky byly vyhodnoceny pro obě daná kritéria.

	pohlaví	věk	TAU (pg/ml)	P-TAU (pg/ml)	A β (pg/ml)	Kritéria dle literatury	Kritéria dle výrobce
1	žena	78	405	67,56	1410,13	hraniční	hraniční
2	muž	51	261	46,53	1509,11	negativní	negativní
3	žena	30	99,98	55,64	1326,73	negativní	hraniční
4	žena	51	364	31,55	840,55	negativní	negativní
5	muž	59	86,5	20,47	732,24	negativní	negativní
6	muž	52	158,5	37,18	1393,01	negativní	negativní
7	muž	28	123,5	33,38	1439	negativní	negativní
8	muž	26	154	33,26	1190,22	negativní	negativní
9	žena	35	135,6	35,67	1367,29	negativní	negativní
10	muž	71	456,6	65,91	1112,87	hraniční	pozitivní
11	muž	72	167,7	30,26	959,09	negativní	negativní
12	žena	50	156	33,15	1323,92	negativní	negativní
13	žena	66	205,09	36	1359,89	negativní	negativní
14	žena	45	95,6	23,85	1166,99	negativní	negativní
15	muž	60	186	37,18	1255,42	negativní	negativní
16	žena	34	124,5	38,64	1075,37	negativní	negativní
17	žena	33	P.m.d.	17,8	1101,22	negativní	negativní
18	muž	74	P.m.d.	24,02	701,26	negativní	negativní
19	žena	58	365,3	39,55	1003,44	negativní	negativní
20	muž	35	88	27,78	1090,78	negativní	negativní
21	muž	33	P.m.d.	9,43	692,44	negativní	negativní
22	muž	61	163	35,78	911,09	negativní	negativní
23	muž	40	411	26,75	1029,91	negativní	negativní
24	žena	50	242,7	52,54	1532,75	negativní	negativní
25	žena	45	P.m.d.	18,74	1121,45	negativní	negativní
26	žena	53	P.m.d.	17,3	276,14	hraniční	hraniční
27	žena	37	207	41,21	1358,42	negativní	negativní
28	muž	49	151	34,43	1184,35	negativní	negativní
29	žena	55	P.m.d.	P.m.d.	P.m.d.	negativní	negativní
30	muž	72	158	17,3	583,91	negativní	negativní
31	žena	68	319,5	69,07	875,94	hraniční	hraniční
32	muž	58	P.m.d.	24,19	889,68	negativní	negativní
33	žena	76	121	31,17	790,87	negativní	negativní
34	muž	50	P.m.d.	12,11	559,79	negativní	hraniční
35	muž	96	P.m.d.				
36	žena	50	97				

(P.m.d. – Pod mezí detekce)

Tab. 17 Druhé měření – změřeno bylo celkem 30 pacientů. Na základě naměřených hodnot jednotlivých biomarkerů byly dle dvojích kritérií zhodnoceny pozitivní, hraniční a negativní výsledky.

	pohlaví	věk	TAU (pg/ml)	P-TAU (pg/ml)	A β (pg/ml)	Kritéria dle literatury	Kritéria dle výrobce
1	muž	60	170,68	31,14	429,31	hraniční	hraniční
2	muž	56	232,22	46,49	725,48	negativní	negativní
3	žena	66	235,02	44,74	548,81	negativní	hraniční
4	muž	56	0	15,9	0	hraniční	hraniční
5	žena	52	309,51	62,03	974,62	hraniční	negativní
6	žena	49	287,84	51,51	664	negativní	negativní
7	žena	54	154,69	20,65	496,76	hraniční	hraniční
8	žena	82	304,73	56,22	248,27	hraniční	hraniční
9	muž	86	0	44,38	871,45	negativní	negativní
10	žena	77	215,8	36,07	353,13	hraniční	hraniční
11	žena	77	235,02	103,32	265,27	pozitivní	pozitivní
12	žena	54	286,61	59,39	551,1	negativní	hraniční
13	žena	80	447,94	52,63	604,4	negativní	negativní
14	muž	77	306,33	52,79	421,63	hraniční	hraniční
15	muž	76	456,15	93,8	710,94	hraniční	hraniční
16	muž	79	330,85	67,03	684,85	hraniční	hraniční
17	žena	47	0	21	622,43	negativní	negativní
18	žena	64	252,11	25,68	500,3	hraniční	hraniční
19	žena	74	353,72	57,74	525,47	negativní	hraniční
20	žena	76	382,09	47,53	832,22	negativní	negativní
21	žena	73	0	0	0	hraniční	hraniční
22	žena	53	171,98	26,25	441,09	hraniční	hraniční
23	muž	63	P.m. d.	53,42	228,89	hraniční	hraniční
24	žena	70	P.m. d.	47,87	303,52	hraniční	hraniční
25	muž	68	P.m.d.	72,69	509,04	hraniční	pozitivní
26	muž	58	P.m.d.	38,73	566,32	negativní	negativní
27	žena	66	P.m.d.	56,68	635,6	negativní	negativní
28	muž	69	P.m.d.	137,75	235,21	pozitivní	pozitivní
29	muž	61	P.m.d.				
30	žena	68	P.m.d.				

(P.m.d. – Pod mezí detekce)

Tab. 18 Třetí měření – změřeno bylo celkem 36 pacientů. Na základě naměřených hodnot jednotlivých biomarkerů byly dle dvojích kritérií zhodnoceny pozitivní, hraniční a negativní výsledky.

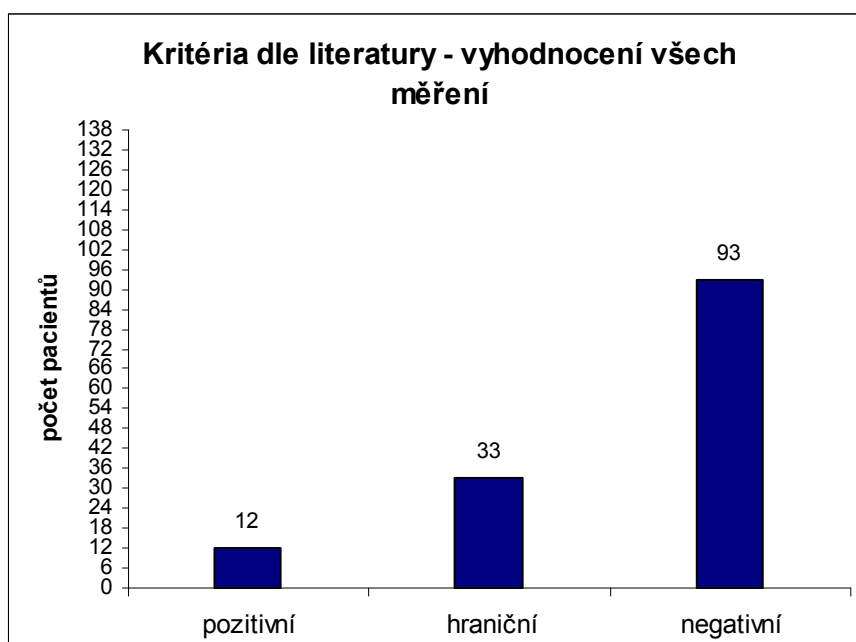
	pohlaví	věk	TAU (pg/ml)	P-TAU (pg/ml)	A β (pg/ml)	Kritéria dle literatury	Kritéria dle výrobce
1.	žena	62	1200	96,9	460,09	pozitivní	pozitivní
2.	žena	67	470,59	39,29	557,14	negativní	pozitivní
3.	muž	68	P.m.d.	73,3	480,24	pozitivní	pozitivní
4.	žena	79	431,51	76,21	158,3	pozitivní	pozitivní
5.	žena	40	111,02	25,5	486,89	hraniční	hraniční
6.	žena	56	189,63	42,54	797,75	negativní	negativní
7.	muž	40	240,43	49,9	764,28	negativní	pozitivní
8.	muž	20	119,85	31,66	544,52	negativní	hraniční
9.	žena	70	257,9	54,11	355,17	hraniční	hraniční
10.	žena	50	213,05	51,73	978,77	negativní	negativní
11.	žena	59	0	0	194,14	hraniční	hraniční
12.	muž	56	220,02	46,02	685,81	negativní	negativní
13.	muž	86	166,62	33,59	717,78	negativní	negativní
14.	žena	22	261,41	54,72	958,44	negativní	pozitivní
15.	žena	77	200,92	43,31	453,82	hraniční	hraniční
16.	muž	25	131,85	34,43	418,98	hraniční	hraniční
17.	žena	55	297,27	61,29	958,44	hraniční	negativní
18.	žena	76	287,66	62,46	911,2	hraniční	negativní
19.	žena	71	325,53	80,28	915,71	hraniční	hraniční
20.	žena	51	718,5	58,8	974,89	negativní	negativní
21.	žena	73	309,63	44,68	363,56	hraniční	hraniční
22.	žena	56	512,26	90,67	1092,47	pozitivní	pozitivní
23.	muž	61	397,89	53,71	586,19	negativní	negativní
24.	žena	30	82,36	16,06	500,92	hraniční	hraniční
25.	žena	32	135,29	27,31	539,77	negativní	hraniční
26.	žena	27	168,32	33,76	833,07	negativní	negativní
27.	muž	71	1200	140,82	238,18	pozitivní	pozitivní
28.	muž	55	216,53	61,47	692,56	hraniční	negativní
29.	žena	56	488,02	63,79	614,58	pozitivní	negativní
30.	muž	57	146,19	47,77	1026,53	negativní	negativní
31.	muž	55	137,13	50,12	730,98	negativní	negativní
32.	žena	51	100,88	20,99	364,54	hraniční	hraniční
33.	muž	26	0	0	0	hraniční	hraniční
34.	žena	35	154,02	26,87	653,61	negativní	negativní
35.	žena	45	0				
36.	žena	38	165,89				

(P.m.d. – Pod mezí detekce)

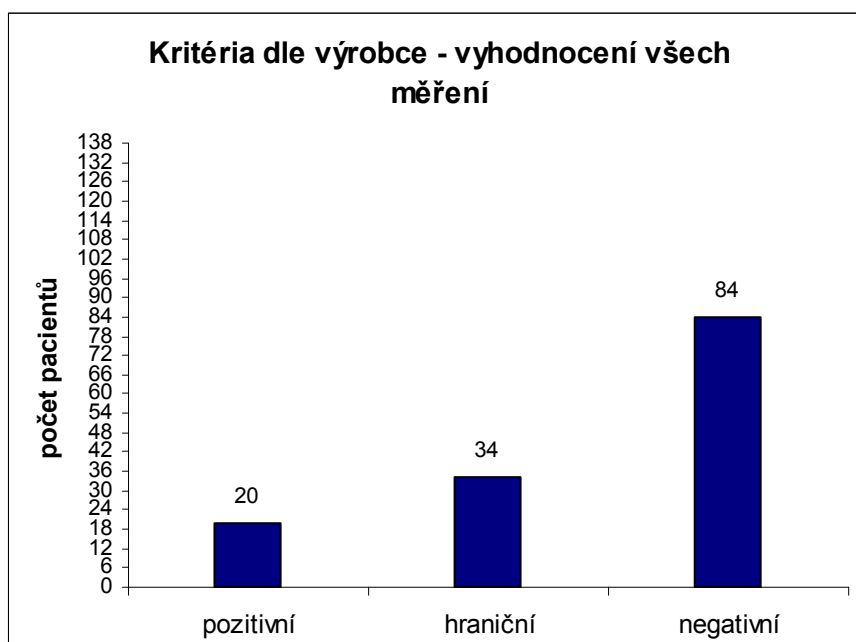
Tab. 19 Čtvrté měření – změřeno bylo celkem 36 pacientů. Na základě naměřených hodnot jednotlivých biomarkerů byly dle dvojích kritérií zhodnoceny pozitivní, hraniční a negativní výsledky.

	pohlaví	věk	TAU (pg/ml)	P-TAU (pg/ml)	A β (pg/ml)	Kritéria dle literatury	Kritéria dle výrobce
1.	žena	71	156,68	26,67	600,79	negativní	negativní
2.	žena	42	92,96	24,01	1025,63	negativní	negativní
3.	žena	65	1200	201,2	1525,49	pozitivní	pozitivní
4.	žena	62	340,83	P.m.d.	1216,25	negativní	negativní
5.	žena	57	145,71	32,22	1275,82	negativní	negativní
6.	žena	58	174,31	32,61	1199,83	negativní	negativní
7.	žena	44	276,37	49,1	1280,7	negativní	pozitivní
8.	žena	72	545,53	81,27	1866,88	pozitivní	pozitivní
9.	žena	76	401,81	34,87	652,58	negativní	negativní
10.	muž	64	228,01	41,14	1220,86	negativní	negativní
11.	žena	46	0	0	0	hraniční	hraniční
12.	muž	68	648,66	53,47	1450,76	negativní	negativní
13.	muž	58	286,89	40,83	1152	negativní	negativní
14.	žena	44	146,59	29,27	1317,54	negativní	negativní
15.	žena	65	301,05	49,35	1261,33	negativní	negativní
16.	muž	54	390,99	74	1545,76	hraniční	pozitivní
17.	muž	47	143,05	25,11	855,24	negativní	negativní
18.	žena	38	101,36	17,05	997,85	negativní	negativní
19.	žena	54	206,61	37,49	1321,6	negativní	negativní
20.	muž	78	531,41	63,47	430,62	pozitivní	pozitivní
21.	žena	71	260,17	42,76	1183,65	negativní	negativní
22.	žena	47	145,71	29,71	1001,68	negativní	negativní
23.	muž	60	236,59	45,43	1391,14	negativní	negativní
24.	žena	53	176,86	42,18	1118,7	negativní	negativní
25.	muž	41	151,43	32,02	1426,7	negativní	negativní
26.	žena	64	437,61	32,22	1316,52	negativní	negativní
27.	žena	48	146,59	32,02	1364,22	negativní	negativní
28.	žena	41	302,67	55,87	1480,2	negativní	pozitivní
29.	muž	23	203,71	24,01	998,62	negativní	negativní
30.	žena	35	289,72	54,51	1453,08	negativní	pozitivní
31.	žena	38	226,37	40,68	1284,62	negativní	negativní
32.	žena	30	405,57	69,23	1671,45	pozitivní	pozitivní
33.	muž	69	741,24	55,65	1464,78	negativní	negativní
34.	žena	47	173,03	28,36	1393,32	negativní	negativní
35.	žena	69	272,32				
36.	muž	54	360,87				

(P.m.d. – Pod mezí detekce)



Obr. 27 Celkové vyhodnocení tripletu biomarkerů (kritéria dle literatury) – celkově bylo zhodnoceno 138 pacientů. Dle těchto kritérií bylo určeno 12 pacientů jako pozitivních, 33 mělo hraniční hodnoty a 93 bylo prokazatelně negativních.



Obr. 28 Celkové vyhodnocení tripletu biomarkerů (kritéria dle výrobce) – celkově bylo zhodnoceno 138 pacientů. Dle těchto kritérií bylo určeno 20 pacientů jako pozitivních, 34 mělo hraniční hodnoty a 84 bylo prokazatelně negativních.

4.3 Vyhodnocení rizikových faktorů u pozitivních pacientů

Celkově bylo změřeno 138 pacientů. Z těchto pacientů bylo na základě vyhodnocovacích kritérií dle výrobce detekováno 20 pozitivních pacientů a na základě kritérií dle literatury bylo detekováno pouze 12 pozitivních pacientů. U těchto pacientů byly hledány rizikové faktory na základě jejich celkové anamnézy. Následně jsme vyhodnotili nejčastější kombinaci faktorů, které mohou být rizikovými faktory rozvoje Alzheimerovy choroby. Jako rizikové faktory jsme vybrali: rodinná genetická anamnéza, diabetes mellitus II. typu, cholesterol, homocystein, obezita, riziko kardiovaskulární chorob, infekce, úroveň vzdělání, trauma mozku, užívání alkoholu a tabákových výrobků. Vyhodnocení možných příčin rozvoje Alzheimerovy choroby je velice důležité, neboť jasná příčina není zatím známa. Pokusili jsme se vyhodnotit rizikové faktory u námi naměřených pozitivních pacientů a tyto faktory porovnat s literaturou.

Na základě anamnéz a dostupných výsledků pozitivních pacientů jsem hledali diagnostikovanou AD v rodině, přítomný diabetes mellitus II. typu, zvýšené hodnoty celkového cholesterolu, prokázanou obezitu - tedy BMI více jak 25kg/m^2 pro obě pohlaví, zvýšené hladiny homocysteinu, proběhlou závažnou infekci v posledních 5 - ti letech, přítomnost užívání návykových látek jako je alkohol a kouření, riziko kardiovaskulárních chorob, úroveň vzdělání nebo prodělané trauma mozku. Na základě údajů jsme se pokusili určit nejčastější rizikový faktor u našich pozitivních pacientů.

Tab. 20 Faktory spojené s výskytem AD

číslo vzorku	pohlaví	věk	rodinná genetická anamnéza	diabetes mellitus II. typu	cholesterol	obezita
1	muž	71	v rodině žádná přítomnost AD	neg.	poz.	ne
2	žena	77	v rodině žádná přítomnost AD	poz.	neg.	ne
3	muž	68	otec AD	poz.	neg.	ne
4	muž	69	v rodině žádná přítomnost AD	neg.	neg.	ne
5	žena	62	matka AD	poz.	poz.	ano
6	žena	67	matka AD	poz.	poz.	ano
7	žena	79	v rodině žádná přítomnost AD	neg.	neg.	ne
8	muž	40	v rodině žádná přítomnost AD	neg.	neg.	ano
9	žena	22	v rodině žádná přítomnost AD	neg.	neg.	ne
10	žena	56	v rodině žádná přítomnost AD	neg.	neg.	ano
11	muž	71	v rodině žádná přítomnost AD	poz.	neg.	ano
12	žena	65	v rodině žádná přítomnost AD	neg.	neg.	ano
13	žena	44	otec AD	neg.	poz.	ano
14	žena	72	v rodině žádná přítomnost AD	neg.	neg.	ne
15	muž	54	v rodině žádná přítomnost AD	poz.	poz.	ano
16	muž	78	v rodině žádná přítomnost AD	poz.	poz.	ne
17	žena	41	v rodině žádná přítomnost AD	neg.	neg.	ne
18	muž	68	otec AD	poz.	neg.	ne
19	žena	35	v rodině žádná přítomnost AD	poz.	poz.	ano
20	žena	30	v rodině žádná přítomnost AD	neg.	neg.	ano

číslo vzorku	homocystein	infekce	OLIGO	alkohol	kouření
1	neg.	ne	neg.	ne	ne
2	neg.	ano	neg.	ne	ne
3	neg.	ne	poz.	ano	ne
4	neg.	ne	poz.	ne	ano
5	neg.	ne	poz.	ne	ne
6	neg.	ano	neg.	ne	ne
7	neg.	ano	neg.	ne	ne
8	neg.	ne	poz.	ano	ano
9	neg.	ne	neg.	ne	ne
10	neg.	ne	neg.	ne	ne
11	neg.	ne	poz.	ne	ne
12	neg.	ano	poz.	ne	ne
13	neg.	ne	neg.	ne	ano
14	neg.	ano	poz.	ne	ne
15	neg.	ano	neg.	ano	ano
16	neg.	ano	poz.	ne	ne
17	neg.	ne	neg.	ne	ne
18	neg.	ne	poz.	ano	ne
19	neg.	ano	poz.	ne	ne
20	neg.	ne	neg.	ne	ne

Všichni pacienti s pozitivním výskytem oligoklonálních páسů jsou typ 4, mají tedy porušenou hematoencefalickou bariéru, kdy imunoglobuliny přecházejí do mozku.

Číslo vzorku	riziko kardiovaskulárních chorob	Úroveň vzdělání	onemocnění, trauma mozku
1	ano	učňovské	ne
2	ano	středoškolské	mozková mrtvice
3	ne	středoškolské	ne
4	ano	středoškolské	mozková mrtvice
5	ne	učňovské	ne
6	ano	učňovské	ne
7	ne	středoškolské	ne
8	ano	učňovské	ne
9	ne	středoškolské	ne
10	ano	učňovské	mozková mrtvice
11	ano	vysokoškolské	mozková mrtvice
12	ne	středoškolské	epilepsie
13	ano	středoškolské	ne
14	ne	středoškolské	ne
15	ano	učňovské	mozková mrtvice
16	ano	vysokoškolské	epilepsie
17	ne	učňovské	ne
18	ne	středoškolské	ne
19	ano	středoškolské	ne
20	ne	učňovské	ne

Z celkového počtu 20 - ti pozitivních pacientů 5 mělo AD v rodinné anamnéze, 9 pacientů mělo diabetes mellitus II. typu, 7 pacientů mělo zvýšenou hladinu cholesterolu, 10 mělo BMI vyšší než 25kg/m², homocystein byl ve všech případech v normě, 8 pacientů prodělalo v posledních 5 - ti letech infekci, 10 pacientů mělo pozitivní výsledky na přítomnost oligoklonálních pásů IgG v likvoru, 4 pacienti měli v anamnéze užívání alkoholu a 4 byli kuřáci, riziko kardiovaskulárních chorob bylo u 11 - ti pacientů, 2 pacienti měli vysokoškolské vzdělání, 10 bylo středoškolsky vzdělaných a 8 bylo vyučeno, trauma mozku bylo přítomno v 7 - mi případech – 5x mozková mrtvice a 2x epilepsie. Z tabulky vyplývá, že nejčastější kombinace rizik byla obezita, cholesterol, diabetes a riziko kardiovaskulárních chorob. Nejčastějším rizikovým faktorem bylo riziko kardiovaskulárních chorob, které bylo zjištěno u 11 - ti pacientů.

5 Diskuse

Diagnóza Alzheimerovy choroby je velmi komplexní otázkou. Pacientova historie a neurologická vyšetření zůstávají základem správné diagnózy. (Giorgio A. & De Stefano N., 2013) Jedinci s AD vykazují nízkou úroveň CSF A β 42 a vysokou úroveň total-tau a p-tau181 ve srovnání s kognitivně normálními, věkově odpovídajícími zdravými jedinci. (Fagan A.M. & Perrin R.J., 2012) Tyto změny detekovatelné v CSF jsme schopni zachytit dříve než atrofii v důsledku zániku neuronů! První rozsáhlá studie CSF A β 42, A β 40 a total tau jako biomarkerů pro AD byla provedena v Japonsku v roce 1998. (Shoji M., 2011) CSF biomarkery poskytují vysokou informativnost, sensitivitu a specifitu pro detekci klinické AD a časných stádií, jejich využití je ale stále omezené. Jeden z hlavních důvodů, navzdory obrovské aplikovatelnosti CSF v AD diagnóze, je lumbální punkce invazivní metoda sběru CSF. (Anoop A. et al., 2010)

Vyšetřována byla skupina o velikosti 138 pacientů, 85 žen a 53 mužů, s věkovým rozpětím od 22 – 96let. U každého pacienta byl změřen zmiňovaný triplet biomarkerů. Pokud bychom vyhodnocovali parametry samostatně, byla by celková skupina pozitivních pacientů mnohem větší. V případě TAU proteinu by se jednalo o 27 pozitivních na základě kritérií dle výrobce a 14 pozitivních dle kritérií z literatury, jak vyplývá z tab. č.13. PHOSPHO-TAU protein čítal 24 pozitivních dle výrobce a 25 pozitivních pacientů dle kritérií z literatury, jak je znázorněno v tab. č.14. β -AMYLOID 37 pozitivních pacientů dle kritérií od výrobce a 29 pozitivních pacientů dle kritérií z literatury, jak vyplývá z tab. č.15. Z výše uvedeného vyhodnocení tripletu markerů pro detekci Alzheimerovy choroby vyplývá, že nelze jednotlivé markery hodnotit samostatně, ale ve vzájemné kombinaci, jak uvádí literatura. Potvrdili jsme, že zvýšené, byť zdánlivě patologicky, hodnoty jednotlivých markerů nelze brát jako diagnostická kritéria nemoci. Z obr. č.6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 16, 20, 21, 22 a 23 lze vysledovat, že hodnoty tau a phospho-tau proteinů se zvyšují s věkem, naopak hodnoty beta-amyloidu s věkem klesají, což je v souladu s literaturou a také s použitým vyhodnocovacím kritériem dle výrobce. Další obr. č.10, 11, 17, 18, 24 a 25 znázorňující četnost pozitivních a negativních pacientů pro jednotlivé markery na základě obou kritérií ukazují, že ve všech třech případech je četnost výskytu pozitivních pacientů vyšší u žen, což obecně odpovídá poznatkům získaným z odborné literatury. Vyhodnocení pozitivit jednotlivých markerů bylo hodnoceno na základě dvou kritérií, jak je vidět na obr. č.12, 19 a 26. První kritéria získaná z odborné literatury a druhá kritéria deklarovaná výrobcem. Na základě tab. č.16, 17, 18 a 19 je viditelné, že se vyhodnocení dle kritérií ne vždy shodují. Z obr. č.27 a 28 je vidět, že počty pozitivních, hraničních a negativních pacientů se na základě kritérií rozcházejí. Pomocí kritérií

získaných na základě literatury bylo stanoveno 12 pozitivních, 33 hraničních a 93 negativních pacientů. Na rozdíl od kritérií doporučených výrobcem, na jejichž základě bylo stanoveno 20 pozitivních, 34 hraničních a 84 negativních pacientů. Kritéria získaná z literatury nevztahují hodnoty β - AMYLOIDU a PHOSPHO - TAU proteinu k věku, pouze TAU protein je závislý na věku. Na rozdíl od kritérií doporučených výrobcem, která jsou všechna vyhodnocována s ohledem na věk. Rozdíl v počtu pozitivních pacientů, dle těchto stanovení, je vcelku znatelný a pozitivní pacient dle jednoho kritéria může být dle druhého negativní, jak je vidět v tab. č.16, 17, 18 a 19, což představuje značné riziko chybné detekce. Na základě získaných dat z anamnézy pacientů, klinického vyšetření kognitivních funkcí, dalších dodatečných testů a v porovnání s našimi výsledky jsme došli k závěru, že diagnosticky lépe odpovídají kritéria daná výrobcem. Dle mého názoru se tedy lepším jeví kritérium doporučené výrobcem, které zohledňuje věk pacienta. Na základě nastudované literatury je zřejmé, že neexistuje plná shoda v obecně platných normách pro jednotlivá měření. Výsledky různých prací se liší.

Dále jsme se zaměřili na zjištění možných rizikových faktorů způsobujících rozvoj Alzheimerovy choroby. Mezi nejvýznamnější riziko rozvoje nemoci patří věk. Výskyt nemoci před 65. rokem života je považován za časný počátek choroby, ovšem nad 65 let riziko výrazně vzrůstá a nad 85 let je četnost výskytu dokonce 50%. (Carotenuto A. et al., 2012) Z námi naměřených pozitivních pacientů je 11 starších 65 let, z toho 5 žen a 6 mužů. Literatura obecně označuje pacienty ve věku nad 65 let jako rizikovou skupinu. Pacienti pod 65 let jsou pak zařazeni do skupiny s časným počátkem nemoci, která je literaturou označována jako vzácná. Z našich pozitivních pacientů je pod hranicí 65 let 9 pacientů, u kterých by se tedy mohlo jednat o časnou formu. Vysoký věk byl tedy potvrzen v souvislosti s Alzheimerovou chorobou v 11 - ti případech, což je více než polovina našich pozitivních pacientů, tím byl potvrzen předpoklad, že nad 65 let riziko vzrůstá.

Z námi získaných pozitivních pacientů je 12 žen a 8 mužů. Pohlaví se tedy jeví jako významný faktor ovlivňující výskyt choroby, kdy ženy jsou více ohroženy rozvojem choroby než muži. S věkem související ztráta pohlavních steroidních hormonů je jedním z rizikových faktorů vývoje AD u žen i mužů. Ztráta estrogenu u žen a androgenů u mužů zvyšuje náchylnost starších jedinců k AD patologii. Existují rozdíly mezi pohlavími v schopnosti odolávat neurologickým chorobám jako je AD. (Vest R.S. & Pike Ch.J., 2013) U žen je například silnější asociace ApoE ϵ 4 alely u AD než u mužů, tato asociace koreluje s větší hypokampální atrofií u žen. (Fleisher A. et al, 2005) Pokusy na transgenních myších, které představovaly pohlavní rozdíly v souvislosti s neuropatologií vykazovaly časnější a více robustní změny u žen než u mužů.

(Callahan M.J. et al., 2001; Lee J.Y. et al., 2002) Estrogen a progesteron mají mnoho neurologických benefitů, které podporují hypotézu, že chrání proti aspektům AD patogeneze. (Pike C.J., 2009) Menopauza mění přirozený cyklus a snižuje cirkulační úroveň estrogenu a progesteronu a jejich neuroprotektivní účinek u postmenopauzálních žen je tedy snížen. (Bonomo S.M. et al., 2009) Pro srovnání, muži obecně ztrácejí svůj primární pohlavní steroidní hormon testosteron pozvolněji. (Morley J.E. et al., 1997) Tyto rozdíly v rychlosti ztráty hladin hormonů mezi pohlavími mohou vysvětlovat větší náchylnost žen k AD. S věkem související pokles testosteronu u mužů má za následek klinický syndrom zvaný androgenní deficit u stárnoucích mužů (ADAM - androgen deficiency in aging males), který je charakterizován zvýšením rizika nemocí a dysfunkcí v androgen - odpovědných tkáních jako jsou kosti, svaly, tuková tkáň a srdce. Mozek je také androgen - odpovědná tkáň a je tedy ovlivněn ztrátou androgenu související s věkem. Androgeny mají řadu protektivních funkcí: a) podporují růst neuronů, regeneraci axonů a synaptické funkce, b) chrání vůči ztrátě neuronů a c) regulují AD související patologii, včetně A β akumulace. (Kaufman J.M. & Vermeulen A., 2005) Jako možná prevence byla prováděna u žen i léčba estrogenem. Záměrem této léčby bylo bojovat proti zdravotním rizikům, která se vyskytují po menopauze, jako osteoporóza a srdeční choroby. Současné studie naznačují, že estrogen nechrání srdce, ale že tento hormon brání rozvoji demence a to několika mechanismy: a) Pomáhá udržet mozkové buňky ve vysoce funkčním stavu tím, že mezi nimi obnovuje ztracená spojení. b) Dále pomáhá s údržbou cholinergního systému v oblastech typicky zasažených Alzheimerovou chorobou. Cholinergní systém totiž uvolňuje nervový přenašeč acetylcholin, který je klíčový pro správné fungování pozornosti a paměti. c) Také se zdá, že estrogen podobně jako jinán, melatonin a vitamín E má antioxidační účinky a proto je schopen chránit mozkové buňky před poškozením volnými radikály. Poslední výzkumy ukázaly, že starší ženy nemusejí estrogení léčbu absolvovat dlouhodobě a přesto pro ně bude prospěšná. (Manly J.J. et al., 2000; Jacobs D.M. et al., 1998)

Námi změřením pozitivní pacienti měli v 5 - ti případech AD v rodinné anamnéze, 3 ve věku nad 65 let a 2 ve věku pod 65 let. U dvou pozitivních pacientů ve věku pod 65 let by se tedy mohlo jednat o časnou formu nemoci. Součástí časně formy je rodinná historie a tedy genetika. Některé z časných forem jsou způsobeny vzácnou autosomálně dominantní mutací v genech kódujících APP, presenilin - 1 a presenilin - 2. Vztah mezi mutacemi, funkcí mutovaných genů a vývojem nemoci podporuje patogenezi AD. (Lambert J. & Amouyel P., 2011) Sporadická forma je multifaktoriální komplex, který zahrnuje genetiku, vlivy prostředí a další zatím i neznámé příčiny možného vzniku nemoci. Hlavní determinantou sporadické AD je z genetického

hlediska ApoE. Studie se zvířecími modely, A β - ApoE2 a A β - ApoE3 komplexy procházely přes BBB podstatně větší rychlostí, než A β - ApoE4 komplex, který je spojen s rozvojem AD. (Deane R. et al., 2008)

9 pozitivních pacientů trpí diabetem II. typu. Diabetes mellitus II. typu (DM2) je charakterizován dvěma klíčovými metabolickými odchylkami: (1) přítomností dysfunkce beta buněk pankreatických ostrůvků sekretovat dostatečné množství inzulínu, tak aby hladina inzulínu byla normální nebo dokonce zvýšená (hyperinzulinemie) k překonání (2) snížené citlivosti tkání na jeho působení (inzulínová rezistence, IR). (Festa et al., 2006) Skupina profesorky de la Monte z Brown University Medical School zjistila, že v mozku nemocných s AD se nacházejí snížené hladiny inzulínu a že řada patologických rysů AD souvisí s poruchou působení inzulínu. S postupem nemoci se hladina inzulínu i hustota jeho receptorů ve specifických oblastech mozku snižuje. (de la Monte S.M. & Wands J.R., 2005) Vztahy mezi DM2 a AD byly prokázány také v nedávno provedených experimentálních studiích, které sledovaly působení inzulínu a inzulínové rezistence při rozvoji kognitivního deficitu křížením dvou známých myších modelů diabetu II. typu (ob/ob a NSY) s myším modelem AD APP23. U obou kmenů diabetická porucha zhoršovala poruchu kognitivních funkcí. Současně byl pozorován pokles hladiny inzulínu i porucha jeho působení v buňce. Diabetes II. typu také zvyšoval depozita β - amyloidu a zánětlivý proces v mozku. (Takeda S. et al., 2010)

V anamnéze pozitivních pacientů se objevovaly i zvýšené hladiny cholesterolu, který je jedním z rizikových faktorů a to u 7 – mi pacientů. Pokusy na krysách s 5 % cholesterol - bohatou dietou po dobu 5 měsíců vyvolávaly: prostorový paměťový deficit, dysfunkci cholinergního systému, BBB poškození a zánět. V kortexu cholesterol - napájených myší úroveň APP, A β (1-42), právě tak jako tau a phospho - tau 181, byla signifikantně zvětšena. (Ehrlich D. & Humpel Ch., 2012) Experimentální studie našly změněné úrovně cholesterolu a jeho metabolitů 24S-hydroxycholesterol (24S - OHC) a 27-hydroxycholesterol (27 - OHC) přispívající k amyloidogenezi nárůstem produkce rozpustného APP. (Popp J. et al., 2012) Lidské postmortem studie ukazují, že subjekty s neuropatologickou diagnózou AD měli značně zvýšené hodnoty LDL (nízkodenzitní lipoprotein) cholesterolu a A β a sníženou úroveň HDL (vysokodenzitní lipoprotein) cholesterolu ve srovnání se zdravými subjekty. (Kuo Y.E. et al., 1998)

Nadměrná spotřeba alkoholu, tedy nemoc zvaná alkoholismus, s sebou nese vyšší riziko Alzheimerovy choroby. Z námi naměřených pozitivních jedinců 4 měli v anamnéze alkoholismus. Ovšem za zmínku stojí protektivní efekt červeného vína. Studie silně podporuje hypotézu, že mírná konzumace červeného vína poskytuje preventivní a terapeutickou hodnotu chránící před AD. Antioxidační aktivita polyfenolů z vína a dalších produktů z hroznů je tedy prospěšná u AD. Dieta bohatá na polyfenoly

=> akumulace bioaktivních metabolitů polyfenolů v mozku => ↓ oxidační stres, ↓Aβ tvorbu ↓ Aβagregaci ↓ abnormální agregaci tau proteinu => snížení rizika AD. (Pasinetti G.M., 2012)

Z našich pozitivních pacientů byli 2 vysokoškolsky vzdělaní, 10 středoškolsky vzdělaných a 8 bylo vyučeno. Toto potvrzuje poznatky získané z literatury které říkají, že vysoce vzdělaní jedinci mají nižší prevalenci a rychlost rozvoje AD než jedinci s nízkým vzděláním.(Barnes & Yaffe, 2011) Také věk pozitivních, vysokoškolsky vzdělaných pacientů je vyšší (71,78 let), což potvrzuje že rychlost rozvoje AD je nižší a nastává tedy ve vyšším věku. Ovšem rychlost konverze MCI jedinců a MCI jedinců v pozdním stádiu do AD byla vyšší u vysoce vzdělaných jedinců na rozdíl od jedinců s nižším vzděláním. Časně stádium MCI jedinců s vysokým vzděláním ukazovalo pomalejší kognitivní pokles v neuropsychologických testech. MCI jedinci v pozdním stádiu s vysokým vzděláním vykazovali rapidnější kognitivní pokles v neuropsychologických testech. Protektivní efekt vysokého vzdělání tedy zůstává v časném stádiu MCI, ale ztrácí se v pozdním stádiu MCI. (Ye B.S., 2013) Efekt vzdělání může být vysvětlen teorií mozkové rezervní kapacity, která nám uvádí, že mozek se vyrovnává s AD patologií pomocí hojného množství neuronů a synapsí. (Fratiglioni L. & Wang H.X., 2007)

Velká spotřeba tabákových výrobků je dalším rizikovým faktorem. Z námi změřených pozitivních pacientů jsou 4 kuřáci. Výsledky studií dokonce naznačují, že zvýšené riziko AD a dalších demencí v asociaci s vystavením se zakouřeným prostředím u nekuřáků bylo podobné jako u aktivních kuřáků. Endoteliální dysfunkce u kuřáků může souviset s redukcí clearance β - amyloidu, který je velmi důležitý v patogenezi AD. (Chen R., 2012) Kuřáci tedy neohrožují jen svoje zdraví, ale zdraví všech ostatních lidí.

Obezita je jedním z rizikových faktorů rozvoje Alzheimerovy choroby a je také rozšířenou nemocí současné populace. Naši pozitivní pacienti byli v 10 - ti případech obézní, tito pacienti měli průměrný věk 52 let, naopak 9 pozitivních pacientů nebylo obézních, z těchto 9 - ti pacientů 7 bylo starších 65 let. Domnívám se, že zde může být souvislost se současnými nálezy, že v časných fázích nemoci dochází k systémovým změnám, které zahrnují i ztrátu hmotnosti. Několik studií demonstrovalo, že nadváha v pozdním věku je spojena s nižším rizikem vývoje demence, tato interakce věku a tělesné kompozice na rozvoj kognitivních změn je zvána "paradox obezity", kde zvýšení BMI ve středním věku se zdá být rizikovým faktorem demence, ale vyšší BMI v pozdním věku se zdá být ochranným faktorem. Preklinická a časná stádia AD jsou spojena s nižší tělesnou hmotností, tedy s nižším BMI pod 25kg/m². Tato hodnota BMI je spojena s vyššími hodnotami AD biomarkerů a větší prevalencí AD positivity.

Přítomnost znaků in vivo markerů mozkového amyloidu a tau proteinu jsou spojeny s nižším BMI u kognitivně normálních nebo MCI jedinců. Vztah BMI a AD patofyziologie zahrnuje neuropatologické změny v oblastech jako je hypotalamus, který hraje roli v regulaci metabolismu a příjmu potravy. (Vidoni E.D. et al., 2011; Ewers M. et al., 2012)

Vysoká koncentrace homocysteinu v krvi (Hcy), také známá jako hyperhomocysteinemie (HHcy), je úzce spojena s kognitivní dysfunkcí a AD patogenezí. (Zhuo J. & Pratico D., 2010) Ovšem souvislost AD patogeneze a vysokých hodnot homocysteinu se u našich pozitivních pacientů nepotvrdila.

Zánětlivá reakce se u našich pozitivních pacientů objevila celkem v 8 - mi případech. Projev zánětlivé reakce organismu získaný z krve nebo lépe z CSF je možným diagnostickým biomarkerem Alzheimerovy choroby. Velké množství zánětlivých molekul, které jsou změněny u AD mohou být detekovány v CSF. Ovšem i u krevních markerů zánětu byla pozorována zvýšená detekce. Množství studií zaznamenalo změny úrovně zánětlivých proteinů v plazmě, které předcházely počátku AD. Rotterdamská studie našla vyšší plazmatickou úroveň ACT (α -1-Antichymotrypsin), IL-6 (interleukin-6) a v menším rozsahu i CRP(C-reaktivní protein), toto bylo asociováno se zvýšením rizika demence a AD. (Engelhart M.J., et al., 2004) Tyto nálezy jsou podpořeny množstvím dalších studií, čímž potvrzují možnou roli plazmatických zánětlivých markerů v předpovědi progresu AD. Periferální krevní mononukleární buňky se ukázaly být užitečnými biomarkery v měření uvolňování cytokinů a toto bylo viditelné ve studii demonstrující zvýšený nárůst sekrece u AD MCI jedinců ve srovnání se zdravými pacienty. (Guierreiro R.J. et al., 2007) Vyšší hodnoty IL-1 a TNF α u starších jedinců jsou také spojovány s nárůstem rizika AD. (Tan Z.S. et al., 2007)

Deprese a stres představují další riziko Alzheimerovy choroby, ovšem z anamnéz pacientů je nelze zjistit. Jedná se ale o rozšířený jev současné uspěchané doby a proto je důležité na toto riziko upozornit. Deprese a apatie jsou mezi nejběžnějšími projevy spojenými s AD. Studie psychiatrických symptomů u 435AD pacientů demonstruje vysokou dávku deprese a ukazuje, že je časnou neuropsychiatrickou abnormalitou. (Craig et al., 2005) Deprese představuje rizikový faktor AD a je možným prodromálním rysem AD. (Wuwongse S., et al., 2010) Obecně je pak známo, že stresový hormon kortizol je pro mozek toxický.

Úrazy hlavy mohou zvyšovat riziko rozvoje AD až 2x. Mozková mrtvice a ischémie mozku jsou rizikovým faktorem přispívajícím k patogenezi Alzheimerovy choroby. Hlavní manifestací je zhoršení axonálního transportu, zduření axonů a tvorba varikozit, což jsou znaky které mohou hrát důležitou roli v patologii AD. (Zhang Q. et

al., 2012) Mozková příhoda se objevuje v 5 - ti případech pozitivních pacientů. Senilní nebo amyloid - obsahující plaky, byly prvně popsány u mozku epileptika v roce 1892. Incidence záchvatů u jedinců s AD - typem demence se jeví být zvýšená speciálně u případů v časném počátku, ačkoli obecně křečovitě episody jsou vzácnější. AD a epilepsie jsou dvě odlišné neurologické choroby, ovšem sdílí řadu patologických rysů. Proč nebo jak je epilepsie spojena s nárůstem AD patologie zůstává neznámo. (Yan X. et al., 2012) Epilepsie se v anamnézách našich pacientů objevila ve 2 případech.

Riziko kardiovaskulárních chorob je u našich pozitivních pacientů zastoupeno v 11 - ti případech. V tomto riziku je zapojeno mnoha dalších faktorů jako je diabetes, cholesterol, obezita a hypertenze, která zvyšuje i riziko mrtvice a lézí v bílé hmotě, poškozují hematoencefalickou bariéru, snižuje mozkovou perfúzi, čímž zvyšuje změny známé u AD patologie. (Peters R., 2012) U všech těchto 11 - ti pacientů se v anamnéze objevuje minimálně další rizikový faktor obezita, diabetes nebo cholesterol. Celkem ve 3 případech se v celkové anamnéze vyskytují všechny tyto faktory – tedy diabetes, cholesterol, obezita a riziko kardiovaskulárních chorob.

V současné době existují léky pouze pro časná stádium, které oddalují kognitivní pokles a udržují určitou životní úroveň. Neustále ale probíhají nové studie pokoušející se vyvinout lék pro Alzheimerovu chorobu. Imunoterapie A β amyloidosy byla přijata jako možné řešení vedoucí k mnoho zajímavým nálezům jako je A β 42 vakcína AN1792, semagacetat či γ -sekretasový inhibitor. První fáze zkoušky A β 42 vakcíny uveřejněné v roce 2008 vykazovaly vedlejší účinky (encefalitidu) a navíc nedocházelo ke zlepšení kognitivních funkcí, ačkoliv amyloidové akumulace v mozku zmizely. Druhá fáze zkoušky vakcíny byla provedena v roce 2009. Z výsledků vyplývá zmírnění akumulace amyloidu v mozku, neuritických abnormalit v hipokampu a pokles fosforylovaných tau – pozitivních nervových buněk, což tedy naznačuje že A β 42 protilátková terapie může být efektivní při tauopatii. Vývoj mnoha látek s terapeutickým účinkem jako je A β vakcína nebo γ - sekretasový inhibitor je nyní zpomalen nedostatkem klinických zkoušek. Určitý skepticismus existuje s ohledem na hypotézu A β amyloidové kaskády, neboť zhoršení demence se nedá zastavit, přestože A β vakcína odstraňuje A β amyloidová depozita. (Hardy J., 2009; Hyman B.T., 2011) Slibná léčebná strategie se zdá být v použití acetylcholinesterasových (AChE) inhibitorů. Několik účinných AChE inhibitorů jako je huperizin nebo galantamin byly úspěšně izolovány z rostlin, což poukazuje na to, že rostliná medicína je dobrý zdroj pro hledání potencionálních AChE inhibitorů. (Yang Z. et al., 2012) Je nutné objasnit všechny molekuly související s každým krokem patologické kaskády AD a upřesnit cílové molekuly pro vývoj terapie a léčby AD.

Na základě tab. č. 20 bylo jako nejčastější rizikový faktor vyhodnoceno riziko kardiovaskulárních chorob, které bylo přítomno u 11 - ti pacientů. Nejčastější kombinací rizik byla obezita, diabetes mellitus II.typu a zvýšená koncentrace cholesterolu. Diabetes mellitus II.typu se vyskytoval v 9 - ti případech, obezita v 10 - ti případech a zvýšený cholesterol v 7 - mi případech.

6 Závěr

Bylo provedeno vyšetření tripletu biomarkerů neurodegenerace Alzheimerovy choroby pomocí solid phase enzymové imunoanalýzy. S výsledkem 20 pozitivních a 34 hraničních pacientů na základě kritérií dle výrobce, na základě kritérií dle literatury bylo 12 pozitivních a 33 hraničních pacientů. Na základě studia anamnéz pacientů, klinických příznaků a jejich diagnóz jsem jako přijatelnější vyhodnotila kritéria daná výrobcem. Metoda byla zavedena na oddělení OKB ve fakultní nemocnici Olomouc. Biomarkery představují časný zdroj detekce patologických změn Alzheimerovy choroby, které postupně nastávají v mozku před samotným propuknutím nemoci.

Před samotným zavedením metody do rutinního provozu je nutné provést verifikaci metody. Byla zvolena verifikační kritéria – opakovatelnost v sérii, mezilehlá přesnost a dolní limit detekce. Prokázali jsme, že metody splňují stanovená verifikační kritéria a jsou vhodné pro rutinní použití v praxi.

Na základě celkových anamnéz pozitivních pacientů byly zhodnoceny rizikové faktory nejčastěji se vyskytující u těchto jedinců. Jako jedním z hlavních rizikových faktorů se jeví pohlaví, neboť z 20-ti pozitivních pacientů bylo 12 žen. Dalším častým rizikem byla kombinace diabetu II. typu, vysokého cholesterolu, obezity a rizika kardiovaskulárních chorob, což v různých kombinacích splňovali téměř všichni pacienti.

Zjištěné výsledky korelují s již známými poznatky v literatuře a tedy, že hodnoty biomarkerů narůstají s věkem, také kombinace biomarkerů zvyšuje přesnost určení správné a včasné diagnózy. 12 pozitivních pacientů ženského pohlaví z celkových 20-ti pacientů výrazně podporuje známou představu, že ženy jsou náchylnější k propuknutí Alzheimerovy choroby.

Stanovení tripletu biomarkerů z mozkomíšního moku je součástí speciální likvorologie a je velice důležitou součástí stanovení diagnózy Alzheimerovy choroby. Interpretace výsledků ovšem není jednoduchá. Diagnóza Alzheimerovy choroby je stanovena nejen na základě změření tripletu v mozkomíšním moku, ale je nutné spolupracovat s klinikem a podstoupit řadu dalších vyšetření, jako jsou psychometrické testy a MRI. Proto je tedy vyšetřením raritním a soustřeďuje se do velkých klinik a neurologických center, zde by měla být tato metoda stanovení tripletu markerů jednoznačně zavedena do praxe, což je i případ zavedení této metody na oddělení OKB ve Fakultní nemocnici v Olomouci. S neustále se zvyšující průměrnou délkou života je, dle mého názoru, toto vyšetření velice důležité. Včasné zachycení patologických změn s pomocí tohoto vyšetření zvyšuje možnost nemocných prožít delší a plnohodnotnější život i s diagnózou Alzheimerovy choroby. Neustále probíhá výzkum zaměřený na hledání dalších biomarkerů, které by bylo možné získávat

například z krve, což by bylo méně invazivní než odběr likvoru. Tyto výzkumy jsou teprve ve fázi testování. Ovšem markery získané z likvoru přímo odrážejí změny nastávající v mozku a proto je, a domnívám se že i delší dobu bude, vyšetření tripletu zásadní metodou detekce.

7 Literatura

7.1 Seznam literatury

1. Anoop A., Singh K., Jakob R. S., Maji S. K., (2010) CSF Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Int J Alzheimers D*, 1 – 12.
2. Arshavsky Y.I., (2006) Alzheimer's disease, brain immune privilege and memory: a hypothesis. *J Neural Transm* 113, 1697 – 1707.
3. Barnes, D. E. and Yaffe, K. (2011). The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol*, 10, 819–828.
4. Baron R., Harpaz I., Nemirovsky A., Cohen H., Monsonego A., (2007) Immunity and neuronal repair in the progression of Alzheimer's disease: A brief overview. *Exp Gerontol* 42, 64 – 69.
5. Bartl J., Meyer A., Brendler S., Riederer P., Grünblatt E., (2013) Different effects of soluble and aggregated amyloid β 42 on gene/protein expression and enzyme activity involved in insulin and APP pathways. *J Neural Transm* 120, 113 – 120.
6. Bonomo, S.M., Rigamonti A.E., Grunta M., Galimberti D., Husita A., Gagliano M.G., Miller E.E., Cella S.G., (2009) Menopausal transition: a possible risk factor for brain pathologic events. *Neurobiol. Aging* 30, 71–80.
7. Borlongan C. V., (2012) Recent preclinical evidence advancing cell therapy for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 237, 142 – 146.
8. Bragdon A. D., Gamon D., (2002) Nedovolte mozku stárnout. Portál s.r.o., Praha, s.12, 13, 19, 20, 61, 64
9. Callahan, M.J., Lipinami W.J., Bian F., Durham R.A., Pack A., Walker L.C., (2001) Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 158, 1173–1177.
10. Callone P. R., Kudlacek C., Vasiloff B. C., Manternach J., Brumback R. A., (2008) Alzheimerova nemoc 300 tipů a rad, jak ji zvládat lépe. Grada Publishing, Praha, s. 28, 43, 60, 78, 79.
11. Capule Ch.C., Yang J., (2012) Enzyme-linked Immunosorbent Assay-Based Method to Quantify the Association of Small Molecules with Aggregated Amyloid Peptides. *Anal. Chem.*, 84, 1786 – 1791.
12. Carotenuto A., Rea R., Colucci L., Ziello A.R., Molino I., Carpi S., Traini E., Amenta F., Fasanaro A.M., (2012) Late and early onset dementia: What is the role of vascular factors? A retrospective study. *J Neurol Science* 322, 170 – 175.

13. Craig, D., Mirakhur, A., Hart, D.J., McIlroy, S.P., Passmore, A.P., (2005)
A crosssectional study of neuropsychiatric symptoms in 435 patients with Alzheimer's disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 13, 460–468.
14. Deane R., Sagare A., Hamm K., Parisi M., Lane S., Finn M.B., Holtzman D.M., Zpolovic B.V., (2008) ApoE isoform-specific disruption of amyloid beta-peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* 118, 4002 – 4013.
15. de la Monte S.M., Wands J.R., (2005) Review of insulin and insulinlike growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: Relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*; 7: 45–61
16. Domínguez R.O., Marschoff E.R., González S.E., Repetto M.G., Serra J.A., (2012) Type 2 diabetes and/or its treatment leads to less cognitive impairment in Alzheimer's disease patients. *Diabetes Res Clin Pract* 98, 68 – 74.
17. Dong S., Duan Y., Hu Y., Zhao Z., (2012) Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. *Transl Neurodegener*, 1 – 12.
18. Dubois B., Feldman H.H., Jacova C., Dekosky S.T., Barberger-Gateau P., Cummings J., Delacourte A., Galasko D., Gauthier S., Jicha G., Meguro K., O'brian J., Pasquier F., Robert P., Rossor M., Salloway S., Stern Y., Visser P.J., Scheltens P., (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease:revising the NINCDS-ARDA criteria. *Lancet Neurol* 6(8), 923-924.
19. Ehrlich D., Humpel Ch., (2012) Chronic vascular risk factors (cholesterol, homocysteine, ethanol) impair spatial memory, decline cholinergic neurons and induce blood-brain barrier leakage in rats in vivo. *J Neurol Sciences* 322, 92 – 95.
20. Engelhart, M. J., Geerlings, M. I., Meijer, J., Kiliaan, A., Ruitenberg, A., van Swieten, J. C., Stijnen, T., Hofman, A., Witteman, J. C., Breteler, M. M.,(2004) Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the rotterdam study. *Arch. Neurol.* 61, 668–672.
21. Ewers M., Schmitz S., Hansson O., Walsh C, Fitzpatrick A., Bennet D., Minthon L., Trojanowski J.Q., Shaw L.M., Faluyi Y.O., Hellas B., Dubois B., Blennow K., Berger K., Stefan J.T., Weiner M., Hampel H., (2012) Body mass index is associated with biological CSF markers of core brain pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33, 1599 – 1608.
22. Fagan A. M., Perrin R. J., (2012) Upcoming candidate cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomarkers Med* 6(4), 455 – 476.

23. Festa A., Williams K., D'Agostino R. Jr, Wagenknecht L.E., Haffner S.M., (2006) The natural course of beta-cell function in nondiabetic and diabetic individuals: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* 55(4): 1114–1120.
24. Fialová I., Bartoš A., Švarcová J., Doležil D., Malbohan I., (2011) Stanovení tau proteinu v mozkomíšním moku pacientů s roztroušenou sklerózou dvěma soupravami ELISA. *Klin Biochem Metab* 19, 113 – 118.
25. Fleisher, A., Grundman M., Jack C.R., Petersen R.C., Tailor C., Kim H.T., Schiller D.H., Baqwell V., Sencakova D., Werner M.F., DeCarli C., Remosky S.T., van Dyck C.H., Thal L.J., (2005) Sex, apolipoprotein E epsilon 4 status, and hippocampal volume in mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* 62, 953–957.
26. Fratiglioni, L. and Wang, H. X. (2007). Brain reserve hypothesis in dementia. *J Alzheimers Dis* 12, 11–22.
27. Geda Y. E., (2012) Mild Cognitive Impairment in Older Adults. *Curr Psychiatry Rep* 14, 320 – 327.
28. Giorgio A., De Stefano N., (2013) Clinical Use of Brain Voltmetry. *J Magn Reson Imaging* 37, 1 – 14.
29. Goedert M., (2009) Oscar Fischer and the study of dementia. *Brain A J Neurol* 132, 1102 – 1111.
30. Gonatas N.K., Anderson W., Evangelista I., (1967) The contribution of altered synapses in the senile plaque: an electron microscopic study in Alzheimer's dementia. *J Neuropathol Exp Neurol* 26, 25 – 39.
31. Guerreiro, R. J., Santana, I., Bras, J. M., Santiago, B., Paiva, A., Oliveira, C., (2007) Peripheral inflammatory Cytokines as biomarkers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurodegener. Dis.* 4, 406–412.
32. Hardy J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem.* 2009;110:1129–1134.
33. Hyman BT. Amyloid-dependent and amyloid-independent stages of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2011;68:1062–1064.
34. Chen R., (2012) Association of environmental tobacco smoke with dementia and Alzheimer's disease among never smokers. *Alzheimer's & Dementia* 8, 590 – 595.
35. Jacobs D.M., Tang M.X., Stern Y., Sano M., Marder K., Bell K.L., Schofield P., Dooneief G., Gurland B., Mayeux R., (1998) Cognitive function in nondemented women who took estrogen after menopause. *Neurology* 50, 368 – 373.
36. Jiráček R., (2011) Stará a nová diagnostická kritéria pro Alzheimerovu chorobu v podmínkách ČR. *Neurol. Prax* 12(2), 131 – 133.

37. Kaufman J.M., Vermeulen A., (2005). The decline of androgen levels elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr.Rev.* 26, 833 – 876.
38. Koudelková M., (2009) Praktické zkušenosti s laboratorní diagnostikou Alzheimerovy nemoci pomocí tau proteinu, fosfor-tau proteinu a beta anuloиду v likvidu. *Neurol. Prax* 10(5), 271 – 274.
39. Koudelková M., (2010) Diagnostika Alzheimerovy demence prostřednictvím proteinů tau, fosfor-tau a beta-amyloidu v mozkomíšním moku. *Labor Aktuell*, 8 – 11.
40. Koukolník F., Jiráček R., (1998) Alzheimerova nemoc a další demence. Grada Publishing, s. 11
41. Krishnan K.J., Ratnaike T.E., De Gruyter H.L.M., Jaros E., Turnbull D.M., (2012) Mitochondrial DNA deletions cause the biochemical defect observed in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33, 2210 – 2214.
42. Kuo Y.M., Emmerling M.R., Bisgaier C.L., (1998) Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain A β 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun.* 252, 711 – 715)(Tan -Z.S. et al., 2003
43. Lambert J., Amouyel P., (2011) Genetics of Alzheimer's disease: new evidence for an old hypothesis? *Current Opinion in Genetics & Development* 21, 295 – 301.
44. Lee, J.Y., Cole T.B., Palmiter R.D., Suh S.W., Koh J., (2002) Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7705–7710.
45. Manly J.J., Merchant C.A., Jacobs D.M., Small S.A., Bell K., Ferin M., Mayeux R., (2000) Endogenous estrogen levels and Alzheimer's disease among postmenopausal women. *Neurology* 54, 833 – 837.
46. Morley, J.E., Kaiser F.E., Perry H.M., Patrick P., Morley P.M., Stauber P.M., Baumgartner R.N., Garry P.J., (1997) Longitudinal changes in testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in healthy older men. *Metabolism* 46, 410–413.
47. Oh H., Mormino E. C., Madison C., Hayenga A., Smiljic A., Jagust W. J., (2011) β -Amyloid affects fronta and posterior brain network in normal aging. *NeuroImage* 54, 1887 – 1895.
48. Panza F., Frisardi V., Seripa D., Logroscino G., Santamato A., Imbimbo B.P., Scafato E., Pilotto A., Solfrizzi V., (2012) Alcohol consumption in mild cognitive impairment and dementia: harmful or neuroprotective? *Int J Geriatr Psychiatry* 27, 1218 – 1238.

49. Pasinetti G.M., (2012) Novel Role of Red Wine-Derived Polyphenols in the Prevention of Alzheimer's Disease Dementi and Brain pathology: Experimental Approaches and Clinical Implications. *Planta Med* 78, 1614 – 1619.
50. Peters R., (2012) Blood pressure, smoking and alcohol use, association with vascular dementi. *Exp Gerontol* 47, 865 – 872.
51. Pike, C.J., Carroll J.C., Rosario E.R., Barron A.M., (2009) Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 239–258.
52. Popp J., Lewczuk P., Kölsch H., Meichsner S., Maier W., Kornhuber J., Jessen F., Lütjohann D., (2012) Cholesterol metabolism is associated with soluble amyloid precursor protein production in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 123, 310 – 316.
53. Pozueta J., Lefort R., Shelanski M. L., (2012) Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models. *Neuroscience*, 1 – 15.
54. Seeman P., Seeman N., (2011) Alzheimer's Disease: β -Amyloid Plaque Formation in Human Brain. *Synapse* 65, 1289 – 1297.
55. Sharma V., Thakur V., Singh S. N., Guleria R., (2012) Tumor Necrosis Factor and Alzheimer's Disease: A Cause and Consequence Relationship. *Psychopharmacology*, 86 – 97.
56. Shoji M., (2011) Biomarkers of the Dementi. *Inter J Alzheimers Dis.*, 1 – 7.
57. Shoji M., (2012) Molecular Approaches to the Treatment, Prophylaxis, and Diagnosis of Alzheimer's Disease: Clinical Molecular and Genetic Studies on Alzheimer's Disease. *J Pharmacol Sci* 118, 345 – 349.
58. Stefanova E., Pavlovic A., Jovanovic Z., Veselovic N., Despotovi I., Stojkovi T., (2012) Vascular risk factors in Alzheimer's disease – Preliminary report. *J Neurol Sci* 322, 166 – 169.
59. Takeda S., Sato N., Uchio-Yamada K., Sawada K., Kunieda T., Takeuchi D., Kurinami H., Shinohara M., Rakugi H., Morishita R., (2010) Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 107(15): 7036–7041.
60. Tan Z.S., Seshadri S., Beiser A., Wilson P.W.F., Kiel D.P., Toćci M., D'Agostino R.B., Wolf P.A., (2003) Plasma Total Cholesterol Level as a Risk Factor for Alzheimer Disease. *Arch Intern Med.*, 163, 1053 – 1057.
61. Tan, Z. S., Beiser, A. S., Vasan, R. S., Roubenoff, R., Dinarello, C. A., Harris, T. B., Benjamin, E. J., Au, R., Kiel, D. P., Wolf, P. A., Seshadri, S., (2007)

- Inflammatory markers and the risk of Alzheimer's disease: The Framingham Study. *Neurology*, 68, 1902–1908.
62. Tariska P., Klein V., Pánczél G., Vitrai J., Knolmayer J., Mészáros Á., Urbanics K., Kiss E., (1997) vascular disease risk factors and findings in patients with Alzheimer's disease. *Arch Gerontol and Geriatr* 25, 237 – 243.
63. Thies W., Bleiler L., (2012) Alzheimer's Association Report, 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 8, 131 – 168.
64. Umeda T., Tomiyama T., Kitajima E., Idomoto T., Nomura S., Lambert M.P., Klein W.L., Mori H., (2012) Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of A β oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. *Life Sci* 91, 1169 – 1176.
65. Vališ M., Taláb R., Andrýs C., Štourač P., Masopust J., Kalnická D., Waberžinek G., (2008) Tau-protein, fosforylovaný tau-protein a beta-amyloid42 v likvoru u demencí a roztroušené sklerózy. *Cesk Slov Neurol N* 71/104(3), 329 – 335.
66. VanItallie T. B., (2013) Preclinical sporadic Alzheimer's disease: target for personalized diagnosis and preventive intervention. *Metabolism Clinical and Experimental* 62, 30 – 33.
67. Vest R.S., Pike Ch.J., (2013) gender, sex steroid hormones, and Alzheimer's disease. *Horm Behav* 63, 301 – 307.
68. Vidoni E.D., Townley R.A., Honea R.A., Burns J.M., (2011) Alzheimer's disease biomarkers are associated with body mass index. *Neurology* 77, 1913 – 1920
69. Wang K., Woung L., Tsai M., Liu Ch., Su Y., Li Ch., (2012) Risk of Alzheimer's disease in relation to diabetes: A population-Based cohort study. *Neuroepidemiology* 38, 237 – 244.
70. Woo H., Baik S., Park J., Gwon A., Yang S., Yun Y., Jo D., (2011) Secretases as therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 404, 10 – 15.
71. Wuwongse S., Chang R.Ch., Law A.C.K., (2010) The putative neurodegenerative links between depression and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 91, 362 – 375.
72. Yan X., Cai Y., Shelton J., Deng S., Luo X., Oddo S., LaFerla F., Cai H., Rose G., Patrylo P.R., (2012) Chronic Temporal Lobe Epilepsy Is Associated with Enhanced Alzheimer-Like Neuropathology in 3xTg-AD Mice. *PLoS ONE* 7, 1- 13.
73. Yang Z., Zhang D., Ren J., Yang M., Li S., (2012) Acetylcholinesterase inhibitory activity of the total alkaloid from traditional Chinese herbal medicine for treating Alzheimer's disease. *Med Chem Res* 21, 734 – 738.

74. Ye B.S., Seo S.W., Cho H., Kim S.Y., Lee J., Kim E., Lee Y., Back J.H., Hong Ch.H., Choi S.H., Park J.H., Bon D. Ku, Moon S.Y., Kim S.Y., Han S., Lee J., Cheong H., Duk L. Na (2013) Effects of education on the progression of early-versus late-stage mild cognitive impairment. *Int Psychogeriatr* 25, 597 – 606.
75. Zeman M., Jiráček R., (2012) Alzheimerova choroba a diabetes mellitus 2. *Neurol. Prax* 13(2), 105 – 108.
76. Zhang Q., Gao T., Luo Y., Chen X., Gao G., Gao X., Zhou Y., Dai J., (2012) Transient Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Induces Early and Chronic Axonal Changes in Rats: Its Importance for the Risk of Alzheimer's Disease. *Plos ONE* 7, 1 – 7.
77. Zhuo J., Pratico D., (2010) Normalization of hyperhomocysteinemia improves cognitive deficits and ameliorates brain amyloidosis of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*, 3895 – 3902.

7.2 Seznam hypertextových odkazů

1. Internet1: <http://zdravi.e15.cz/clanek/sestra/demence-z-klinickeho-pohledu-284892>, 2013 – 02 - 22
2. Internet 2: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/demence-v-klinicke-praxi-v-roce-2011-462909>, 2013 – 02 - 22
3. Internet3 <http://zdravi.e15.cz/clanek/sestra/vyzkum-diagnostika-a-terapie-alzheimerovy-nemoci-466849>, 2013 – 02 – 22

8 Seznam použitých zkratek

A β	Amyloid-beta
ACT	Antichymotrypsin
ADAM	Androgen deficiency in aging males
AD	Alzheimerova choroba
AChE	Acetylcholinesterasa
AMK	Aminokyselina
AICD	APP intracelulární C-terminální doména
ApoE	Apolipoprotein E
APP α	Amyloid prekursorový protein štěpený α -sekretásou
APP β	Amyloid prekursorový protein štěpený β -sekretásou
APP	Amyloidní prekursorový protein
BBB	Blood Brain Barrier – hematoencefalická bariéra
Bio	Biotin
CNS	Centrální nervová soustava
CRP	C-reaktivní protein
CSF	Cerebrospinal fluid – mozkomíšní mok – likvor
CV	Variační koeficient
DM2	Diabetes mellitus II. typ
FAD	Familiární AD
HDL	Vysokodenzitní lipoprotein
HRP	Křenová peroxidasa
IL	Interleukin
L3 – L5	Bederní obratle
LDL	Nízkodenzitní lipoprotein
LOD	Limit detekce
MCI	Mild cognitive impairment – Mírné kognitivní zhoršení
MRI	Magnetická resonance
NFT	Neurofibrillary tangles – neurofibrilární klubka
NINCDS – ADRDA	National Institute of Neurological Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
PET	Pozitronová emisní tomografie
p-tau	Phospho-tau protein
sAPP α	Solubilní APP α
sAPP β	Solubilní APP β