

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Vanesa Jurášová**

Biofluidní biomarkery Alzheimerovy nemoci a nemoci s Lewyho tělísky  
a jejich vztah ke kognitivním a strukturálním markerům

*Biofluid biomarkers of Alzheimer's disease and Lewy body disease and their  
relationship with cognitive and structural markers*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Mgr. Kateřina Veverová, Ph.D

Praha, 2022

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.8.2022

Vanesa Jurášová

.....

## **Poděkování:**

Mé upřímné poděkování patří všem, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. V první řadě patří poděkování mé školitelce RNDr. Mgr. Kateřině Veverové, Ph.D., která mě během těchto dvou let podporovala ať už v pracovním, ale i v osobním směru. Děkuji za pomoc, za užitečné rady při vypracovávání diplomové práce a za všechny pracovní možnosti, které se mi díky Vám naskytly.

Děkuji i MUDr. Zuzaně Nedělské, M.Sc. za pomoc při psaní diplomové práce, za pracovní příležitost a možnost spolupráce s Vámi. Vám, RNDr. Mgr. Kateřině Veverové, Ph.D. a prof. MUDr. Jakubovi Hortovi Ph.D. jsem velmi vděčná za pomoc při získání finanční podpory od Grantovy agentury Univerzity Karlovy k projektu Nové biofluidní biomarkery a jejich role v diagnostice a prognóze neurodegenerativních demencí.

Mé poděkování patří také RNDr. Jitce Hanzalové za pomoc při laboratorní práci a za to, že se se mnou podělila o mnoho z jejích získaných zkušeností nejen z laboratorního prostředí.

V neposlední řadě patří mé velké děkuji celé mé rodině za nekonečnou podporu. Během celého mého dosavadního studia mi vytvářeli vhodné podmínky pro vzdělávání a pro osobnostní růst. Děkuji Vám za možnost pokračovat v mém studiu i nadále.

Tuto práci bych ráda věnovala mému starkému. Právě kvůli němu jsem se studiu neurodegenerativních onemocnění věnovat začala. Doufám, že výsledky nejen této, ale i mých budoucích prací, přidají ruku k celkovému dílu správné a včasné diagnostiky a potenciální léčby neurodegenerativních onemocnění.

## **Abstrakt**

Diagnostika Alzheimerovy nemoci je v současné době založena na stanovení přítomnosti specifických proteinů v cerebrospinální tekutině (CSF), případně jejich zobrazení pomocí pozitronové emisní tomografie. Obě tyto metody jsou invazivní a mohou pacienta vystavit jistému riziku a diskomfortu. Krevní biomarkery proto představují naději pro včasnou diagnostiku a monitoraci jedinců ve zvýšeném riziku rozvoje Alzheimerovy nemoci. Cílem diplomové práce bylo stanovit biomarkery v krvi pomocí ultrasenzitivní Simoa TM (Single molecular assay) technologie a ověřit jejich vztah k hodnotám v CSF. Druhým cílem bylo vysledovat vztah mezi krevními biomarkery a kognitivními markery Alzheimerovy nemoci. Prokázali jsme, že mezi sérovými, plazmovými a CSF koncentracemi p-tau 181 existuje pozitivní vztah. Negativní korelace byla sledována mezi koncentracemi p-tau 181 v krvi a výsledky MMSE testu, který je považován za standardní nástroj kognitivního hodnocení.

Tato zjištění naznačují, že plazmatický a sérový p-tau 181 může výrazně pomoci ke klinické identifikaci neurodegenerativních onemocnění v primární péči. Negativní korelace plazmatického a sérového p-tau 181 s výsledky MMSE testu naznačuje, že by mohl být krevní p-tau 181 používán v populačních studiích k detekci jedinců s vysokým rizikem rozvoje Alzheimerovy nemoci a tím pádem mohl pomoci správně zařadit tyto pacienty do klinických studií.

### **Klíčova slova**

Alzheimerova nemoc, krevní biomarkery, mírná kognitivní porucha, kognice, Simoa

## **Abstract**

The diagnosis of Alzheimer's disease is based on the determination of specific proteins in cerebrospinal fluid (CSF) or their imaging using positron emission tomography. Both methods are invasive and can expose the patient to risk and discomfort. Blood biomarkers, therefore, represent hope for early diagnosis and monitoring of individuals at increased risk of developing Alzheimer's disease. The diploma thesis aimed to determine biomarkers in blood using the ultrasensitive Simoa TM (Single molecular assay) technology and to verify their relationship to the values in CSF. The second aim was to track the relationship between blood biomarkers and cognitive markers of Alzheimer's disease. We demonstrated a positive relationship between serum, plasma, and CSF p-tau 181 concentrations. A negative correlation was observed between the concentrations of p-tau 181 in blood and the results of the MMSE test, which is considered a standard cognitive assessment tool.

These findings suggest that plasma and serum p-tau 181 may greatly help the clinical identification of neurodegenerative diseases in primary care. The negative correlation of plasma and serum p-tau 181 with MMSE test results suggests that blood p-tau 181 could be used in population-based studies to detect individuals at high risk of developing Alzheimer's disease and thus help to enroll these patients in clinical trials correctly.

## **Key words**

Alzheimer's disease, blood-based biomarkers, mild cognitive impairment, cognition, Simoa

## Obsah

|  |    |
|--|----|
| 1. ÚVOD .....  | 9  |
| 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....   | 10 |
| 2.1 Neurodegenerativní onemocnění .....  | 10 |
| 2.1.1 Alzheimerova nemoc .....   | 13 |
| 2.1.2 Onemocnění s Lewyho tělísky .....  | 18 |
| 2.1.3 Frontotemporální lobární degenerace .....  | 20 |
| 2.2 Biomarkery .....   | 21 |
| 2.3 AT(N) kritéria .....   | 29 |
| 2.4 Techniky měření biofluidních markerů .....   | 30 |
| 3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....  | 34 |
| 4. MATERIÁL A METODY .....   | 35 |
| 4.1 Výzkumný soubor .....  | 35 |
| 4.2 Stanovení koncentrace biomarkerů v CSF pomocí metody ELISA .....                   | 38 |
| 4.3 Stanovení koncentrace biomarkerů v plazmě a séru pomocí Simoa<br>technologie ..... | 38 |
| 4.4 Statistická analýza .....  | 39 |
| 5. VÝSLEDKY .....  | 41 |
| 6. DISKUSE .....   | 55 |
| 7. ZÁVĚR .....   | 58 |
| 8. LITERATURA .....  | 60 |

## Seznam zkratk

A $\beta$ = amyloid beta

AGD= nemoc s argyrofilními zrny

ALS= amyotrofická laterální skleróza

aMCI= amnestická mírná kognitivní porucha

AN= Alzheimerova nemoc

*APOE*  $\epsilon$ 4= apolipoprotein  $\epsilon$ 4

APP= amyloidový prekurzorový protein

CBAS= z angl. *Czech Brain Aging Study*

CBD= kortikobazální degenerace

CHMP= z angl. *Medicinal Products for Human Use*

CNS= centrální nervový systém

CSF= cerebrospinální tekutina (z angl. *cerebrospinal fluid*)

CT= výpočetní tomografie

DLB= demence s Lewyho tělísky

EDTA= kyselina ethylendiamintetraoctová

EMA= Evropská léková agentura

ELISA= z angl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FDA= Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv

fMRI= funkční magnetická rezonance

FTLD= frontotemporální lobární degenerace

FTLD-tau= frontotemporální lobární degenerace spojená s patologií tau

FTLD TDP= frontotemporální lobární degenerace spojená s patologií TDP 43

hnRNP= heterogenní jaderný ribonukleoprotein

LBD= onemocnění s Lewyho tělísky (z angl. *Lewy body disease*)

MCI= mírná kognitivní porucha (z angl. *mild cognitive impairment*)

MCI-LB= mírná kognitivní porucha s Lewy body příznaky

MCI-PN= Parkinsonova nemoc doprovázena mírnou kognitivní poruchou

MMSE= z angl. *Mini Mental State Examination*

MPRAGE= z angl. *Magnetisation Prepared Rapid Gradient Echo*

MRI= magnetická rezonance

naMCI= neamnestická mírná kognitivní porucha

NfH= těžká neurofilamenta

NfL= lehká neurofilamenta

NfM= střední neurofilamenta

NIA-AA= Národní institut pro stárnutí a Alzheimerovu asociaci

NMDA= N-methyl-D-aspartát

PDD= Parkinsonova nemoc s demencí

PET= pozitronová emisní tomografie

PHF= párová helikální vlákna

PiB= pittsburghská sloučenina B

PiD= Pickova choroba

PN= Parkinsonova nemoc

PSP= progresivní supranukleární paralýza

RBD= porucha chování v REM spánku (z angl. *REM sleep behavior disorder*)

TDP-43= DNA vázící protein 43



# 1 Úvod

Neurodegenerativní onemocnění jsou skupinou klinicky heterogenních onemocnění charakterizovaných progresivní ztrátou nebo dysfunkcí neuronů během stárnutí v centrálním nebo periferním nervovém systému (Gao et al., 2018). Mírná kognitivní porucha (MCI) je klinický syndrom, vyznačující se objektivním poškozením kognitivních funkcí a představuje stádium mezi kognitivními změnami fyziologického stárnutí a změnami spojenými s rozvinutým syndromem demence (Petersen et al., 1997). Demence je v zemích prvního světa 5. nejčastější příčinou mortality dospělých. Alzheimerova nemoc (AN) je nejčastější příčinou syndromu demence (50–70 % případů).

Definitivní diagnóza neurodegenerativních onemocnění je možná pouze na základě neuropatologického vyšetření *post mortem*. Během života pacienta je možné stanovit diagnózu pouze na úrovni “možné” a “pravděpodobné”. Nicméně taková diagnóza se s finální liší až ve 20 % případů. Z tohoto faktu vyplývá potřeba zpřesnit diagnostický postup během života pacienta, a to jak pro léčbu, tak i pro samotný vývoj léku neurodegenerativních onemocnění. Biologické markery asociované s patofyziologickým procesem často korelují s klinickou progresí nemoci a umožňují *in vivo* diagnostiku a případné nasazení dostupné terapie nebo non-farmakologické intervence. Biofluidní biomarkery mají potenciál optimalizovat diagnostickou přesnost a odhalit onemocnění v dřívějších stádiích a možná i presymptomaticky, jako například před strukturálními změnami neurodegenerace pozorovanými při neurozobrazování, a zároveň poskytnou důkazy o účinnosti terapie (Hampel et al., 2010). Jejich velkou výhodou je relativně nízká cena (například v porovnání s pozitronovou emisní tomografií (PET)), a v případě krve i nenáročnost vyšetření a malá invazivita.

Cílem mé diplomové práce je shrnout dostupné informace o neurodegenerativních onemocněních, biomarkerech těchto onemocnění se zaměřením na biofluidní biomarkery AN. V praktické části práce je mým hlavním cílem porovnat koncentrace naměřených hodnot dvou vybraných biomarkerů neurodegenerativních onemocnění, p-tau 181 a lehkého neurofilamenta (NfL) v CSF, plazmě a séru.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Neurodegenerativní onemocnění

Neurodegenerativní onemocnění jsou poruchy charakterizované progresivním poškozením motorických a/nebo kognitivních funkcí. Typicky se neurologické symptomy poprvé objevují po středním věku a zhoršují se v průběhu onemocnění. Histopatologicky mají tato onemocnění společné rysy, včetně ukládání nerozpustných proteinů, aktivace gliových buněk a odumírání nervových buněk (Pihlstrøm et al., 2018). Zatímco většina neurodegenerativních onemocnění je sporadická, existují i familiární formy, které vykazují mendelovskou dědičnost s mutací v genu kódujícím protein, který buď přímo, nebo nepřímo usnadňuje tvorbu agregátů (Katsuno et al., 2018). Zapojení funkčních systémů se mezi jednotlivými poruchami liší, a je spojeno se širokým spektrem klinických projevů. Důležitou vlastností je ukládání proteinů se změněnými fyzikálně chemickými vlastnostmi, také známých jako chybně poskládané proteiny. Koncept konformačních chorob znamená, že strukturální konformace fyziologického proteinu se mění, což vede ke změněné funkci nebo potenciálně toxické intra nebo extracelulární akumulaci (Carrell and Lomas, 1997). Nejčastějšími neurodegenerativními nemocemi jsou amyloidózy, tauopatie,  $\alpha$ -synukleinopatie a proteinopatie DNA vázícího proteinu 43 (TDP-43) (Alafuzoff et al., 2009; Alafuzoff et al., 2015).

U neurodegenerativních onemocnění rozlišujeme dle přítomnosti a tíže kognitivního postižení tedy tři stadia:

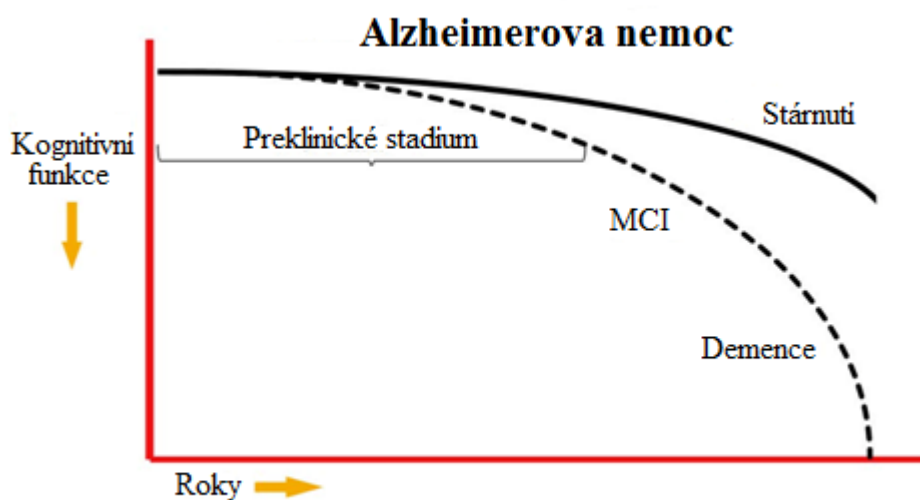
**1. Preklinické stadium** je ze všech stadií nejdéle trvající. V tomhle stadiu jsou již přítomny neuropatologické změny mozku, avšak u pacientů se klinicky nemoc neprojevuje. Neznamená ji tak subjektivně pacient ani jeho okolí. Pacient nevykazuje kognitivní deficit měřeno pomocí standardních neuropsychologických testů (Vyhnálek et al., 2020). Preklinická fáze Alzheimerovy nemoci (AN) začíná asymptomatickou mozkovou amyloidózou. Monomerní amyloid beta ( $A\beta$ ) se začíná agregovat, opouští svůj rezervoár v cerebrospinální tekutině (CSF; z angl. *cerebrospinal fluid*) a začíná se hromadit na povrchu neuronů a synapsích. Během první fáze preklinického stadia však tyto změny ještě nejsou pomocí současných technik zjištělné. Kognitivní deficity se zatím neprojevují. Během druhé fáze preklinického stadia se stávají detekovatelné určité biomarkery CSF, jako je zvýšený tau CSF, hypometabolismus v zadním cingulu a kortikální ztenčení (Sperling et al., 2011a). Pacient však stále nevykazuje žádné příznaky typu demence.

Ve třetí fázi preklinického stadia začíná pacient zjišťovat jemné symptomy, zatímco biomarkery stále přibývají a existuje měřitelný pokles od výchozího výkonu pacienta (Sperling et al., 2011a). Předpokládá se, že jakmile člověk dosáhne fáze jedná preklinického stadia AN a bude žít dostatečně dlouho, nakonec se u něj AN rozvine (Jack et al., 2012).

**2. Stadium mírné kognitivní poruchy (MCI; z angl. *mild cognitive impairment*)** předchází stadiu syndromu demence (Vyhnálek et al., 2020). V roce 1997 Petersen a kol. definovali MCI jako klinický a neuropsychologický syndrom, který je charakterizován vznikající kognitivní poruchou, tj. přechodným stavem mezi fyziologickým stárnutím a demencí. Kvůli svému potenciálně progresivnímu charakteru se MCI stala patologickým stavem (Petersen et al., 1997). U tohoto stadia se už střetáváme s postižením kognitivních funkcí, ale soběstačnost a aktivity denního života zůstávají v zásadě zachovány (Vyhnálek et al., 2020). MCI se dělí na amnestickou (aMCI) a neamnestickou formu (naMCI), s poruchami ve více nebo jednotlivých kognitivních doménách. U aMCI převládá ztráta paměti a je spojena se značným rizikem dalšího rozvoje AN (Albert et al., 2011). Mezi kritéria pro diagnózu tohoto syndromu patří stížnosti pacienta nebo jeho okolí na nově vzniklou poruchu kognice, objektivní průkaz postižení jedné či více kognitivních funkcí při zachování soběstačnosti pacientu, a nepřítomnost syndromu demence (Vyhnálek et al., 2020). Nejspecifičtější pro AN je narušení v oblasti epizodické paměti (Obouidiyat et al., 2013). Kognitivní testy u pacientů s MCI odhalí skóre mezi 1 a 1,5 standardní odchylky pod průměrem pro jejich věk a úroveň vzdělání. Pokud jsou k dispozici CSF nebo zobrazovací biomarkery, pozitivní biomarker A $\beta$  (snížené hladiny A $\beta$  v CSF a zvýšené vychytávání PET pittsburghské sloučeniny B (PiB)) a pozitivní biomarkery neuronálního poškození naznačují vysokou pravděpodobnost, že MCI je způsobena patologií AN (Albert et al., 2011). Kromě toho byly identifikovány biologické i epidemiologické rizikové faktory progresu onemocnění z MCI do demence, včetně apolipoproteinu  $\epsilon$ 4 (*APOE  $\epsilon$ 4*), deprese, osamělosti, sluchového postižení, cukrovky, hypertenze, vyššího věku nebo ženského pohlaví (Li et al., 2016). Přibližně 15 až 20 % lidí ve věku 65 let nebo starších trpí syndromem MCI (Roberts and Knopman, 2013). Nedávný systematický přehled 32 studií zjistil, že průměrně u 32 % jedinců s MCI se během 5 let rozvinula AN (Ward et al., 2013).

**3. Stadium syndromu demence** lze charakterizovat postižením minimálně dvou kognitivních funkcí, které je natolik výrazné, že již dochází k narušení soběstačnosti a aktivit denního života. Pacienti se syndromem demence jsou tedy v různé míře závislí na svých blízkých nebo pečovateli. Syndrom demence je považován za vyvrcholení patologických

procesů u neurodegenerativních onemocnění, jedná se tedy o stadium terminální (Obrázek 1). Demence se dále dle tíže kognitivního postižení, které je charakterizováno vyšší dosaženého skóre v testu MMSE (z angl. *Mini Mental State Examination*) dělí na tři stadia: lehká, středně těžká a těžká demence (Vyhnálek et al., 2020). V roce 2015 trpělo demencí téměř 50 milionů lidí na celém světě. Jak populace roste a stárne očekává se, že do roku 2050 počet postižených překročí 130 milionů lidí (Drew, 2018). AN je zdaleka nejčastější příčinou syndromu demence a představuje až 80 % všech diagnóz demence (Crous-Bou et al., 2017).



Obrázek 1 *Stádia Alzheimerovy nemoci* (upraveno dle Alzheimer's association, 2016).

Posmrtná sledování velkého počtu lidských mozků od pacientů s různou klinickou a patologickou závažností naznačila, že mnohé neurodegenerativní poruchy mají stereotypní progresi, kterou lze popsat podle stádií. Schémata stádií byla vyvinuta pro AN, ale i pro Parkinsonovu nemoc (PN), onemocnění s Lewyho tělísky (LBD; z angl. *Lewy body disease*), amyotrofickou laterální sklerózou (ALS), frontotemporální lobární degeneraci spojenou s patologií TDP-43 (FTLD-TDP) a chronickou traumatickou encefalopatií (Dugger and Dickson, 2017).

### 2.1.1 Alzheimerova nemoc

Stárnutí populace se stalo celosvětovým fenoménem. Zprávy z Programu stárnutí OSN a Centra pro kontrolu a prevenci nemocí USA předpokládají, že počet starších lidí (65+ let) ve světě vzroste ze 420 milionů v roce 2000 na téměř 1 miliardu do roku 2030. Podíl starších lidí se zvýšil ze 7 % na 12 %. Největší nárůst absolutních počtů starších osob zaznamenají rozvojové země. Podíl rozvojových zemí na celosvětové stárnoucí populaci se tak zvýší z 59 % na 71 %. Protože výskyt AN je silně spojen se zvyšujícím se věkem se očekává, že toto onemocnění bude představovat obrovské výzvy pro veřejné zdravotnictví a systémy péče o seniory ve všech zemích světa (Qiu et al., 2009). AN, která představuje nejčastější příčinu syndromu demence, postihuje více než 50 milionů lidí na celém světě. Okrádá lidi o jejich soběstačnost a je pátou nejčastější příčinou smrti (Hodson, 2018).

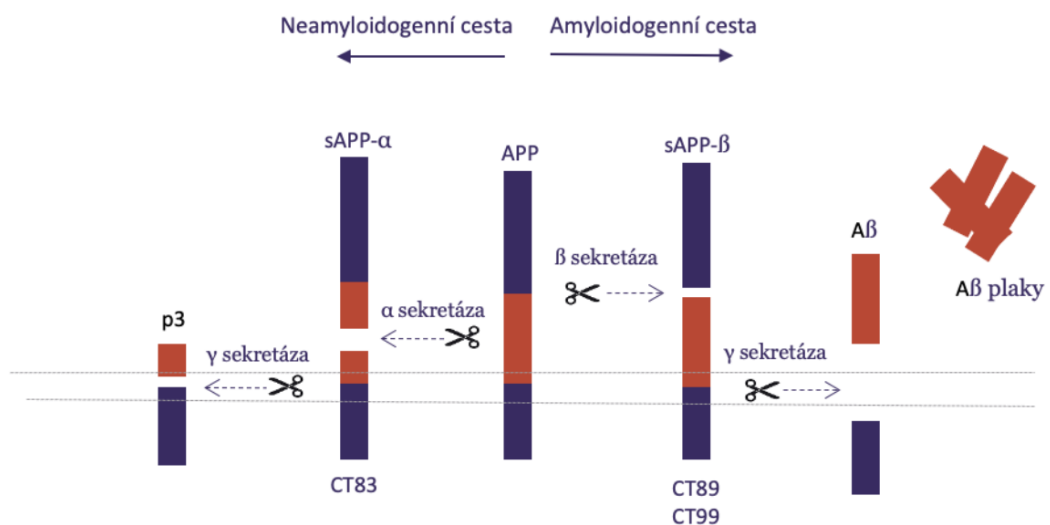
Klíčovými patologickými znaky AN jsou extraneuronální toxické amyloidní oligomery a proteiny, intraneuronální neurofibrilární klubka sestávající z hyperfosforylovaného tau, regionálně specifický snížený cerebrální glukózový metabolismus a synaptická a mitochondriální dysfunkce. V posledních letech bylo navrženo několik hypotéz k vysvětlení abnormálních procesů vedoucích k ukládání patologických forem amyloidu a tau (Gibson and Shi, 2010).

#### **Beta amyloid**

Hypotéza amyloidní kaskády, původně navržená v roce 1992 (Hardy and Higgins, 1992), je podporována genetickými a biochemickými daty a je dominantním modelem patogeneze AN. Model je založen na postupném ukládání fibrilárního A $\beta$  ve formě difúzních plaků, které spouští zánětlivou reakci, změněnou iontovou homeostázu, oxidační stres a změněnou aktivitu kinázy/fosfatázy, což vede k tvorbě neurofibrilárních klubek a k rozsáhlé synaptické dysfunkci a ztrátě neuronů (Selkoe and Hardy, 2016). Amyloidní hypotéza naznačuje, že akumulace patologických forem A $\beta$  produkovaných sekvenčním štěpením amyloidového prekurzorového proteinu (APP) enzymy  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázy v mozku je primární patologický proces, který je řízen nerovnováhou mezi produkcí a odstraňováním A $\beta$ . Silná podpora centrální role A $\beta$  pochází z genetiky: všechny mutace familiární AN se účastní buď tvorby nebo zpracování A $\beta$  a vedou k relativní nadprodukci toxických forem A $\beta$  (Jonsson et al., 2012).

A $\beta$  je peptid zpracovaný APP enzymy  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázou (Bateman et al., 2011). APP je transmembránový integrální glykoprotein typu 1 o velikosti 110-130 kDa (Roberts et al., 1994) a představuje jeden z nejhojnějších proteinů v centrálním nervovém systému (CNS). V lidských tkáních je všudypřítomně exprimován a nachází se v plazmatické membráně a

také v několika organelách, jako je endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a mitochondrie (Rhein and Eckert, 2007). Metabolizován je dvěma odlišnými a vzájemně se vylučujícími cestami: sekreční cestou, která je neamyloidogenní, a amyloidogenní cestou (Obrázek 2). V prvním případě je APP nejprve štěpen  $\alpha$ -sekretázou, přičemž se uvolní rozpustný N-koncový fragment (sAPP $\alpha$ ) a C-koncový fragment (C83), který je dále štěpen  $\gamma$ -sekretázou za vzniku menšího C-koncového 3 kDa fragmentu (C3). Štěpení APP  $\alpha$ -sekretázou nastává v sekvenci aminokyselin, které patří k peptidu A $\beta$ , a proto vylučuje tvorbu amyloidních peptidů (Braak and Braak, 1998b). V dráze amyloidogenní je APP alternativně štěpen  $\beta$ -sekretázou, přičemž se uvolňuje menší N-terminální fragment (sAPP $\beta$ ) a delší C-terminální fragment (C99), který obsahuje úplnou amyloidogenní sekvenci aminokyselin. Další štěpení APP  $\gamma$ -sekretázou poskytuje peptidy A $\beta$ . Peptidy A $\beta$  se uvolňují jako monomery, které se postupně agregují do dimerů, trimerů, oligomerů, protofibril a fibril, aby se nakonec uložily a vytvořily amyloidní plaky (Recuero et al., 2004).



Obrázek 2 **Tvorba amyloidu beta (A $\beta$ ).** Sekreční cestou, tedy neamyloidogenní, je amyloidový prekurzorový protein (APP) štěpen  $\alpha$ -sekretázou na solubilní APP (sAPP $\alpha$ ) a karboxyterminální fragment 83 (C83). Amyloidogenní cestou dochází ke štěpení APP  $\beta$ -sekretázou na sAPP $\beta$  a C99. C99 je následně štěpen  $\gamma$ -sekretázou za tvorby A $\beta$  (upraveno dle Čechova et al., 2019).

Oligomery A $\beta$  jsou považovány za nejtoxičtější formy amyloidních derivátů (Roberts et al., 1994). Interagují s neurony a gliovými buňkami, což vede k aktivaci prozánětlivých kaskád, mitochondriální dysfunkci a zvýšenému oxidačnímu stresu, narušení

intracelulárních signálních drah a synaptické plasticity, zvýšení fosforylace tau, zvýšení GSK 3 $\beta$  aktivity, deregulaci metabolismu vápníku, indukci neuronální apoptózy a buněčné smrti. Tyto mechanismy dohromady vedou ke vzniku samočinné, pozitivní zpětné vazby, ve které produkce peptidů A $\beta$  vede ke škodlivým událostem pro neuronální buňky, což zase vede k dysfunkci metabolismu APP a větší produkci peptidů A $\beta$ . Fibrily A $\beta$  se ukládají do neuritických plaků v sekvenčním vzoru: difuzní neuritické plakky, zralé neuritické plakky, senilní plakky a fantomy senilních plaků v pokročilejších stádiích onemocnění. Tvorba plaku má také škodlivý dopad na neurony, což také vede k jejich dysfunkci, a nakonec k jejich smrti (Rhein and Eckert, 2007).

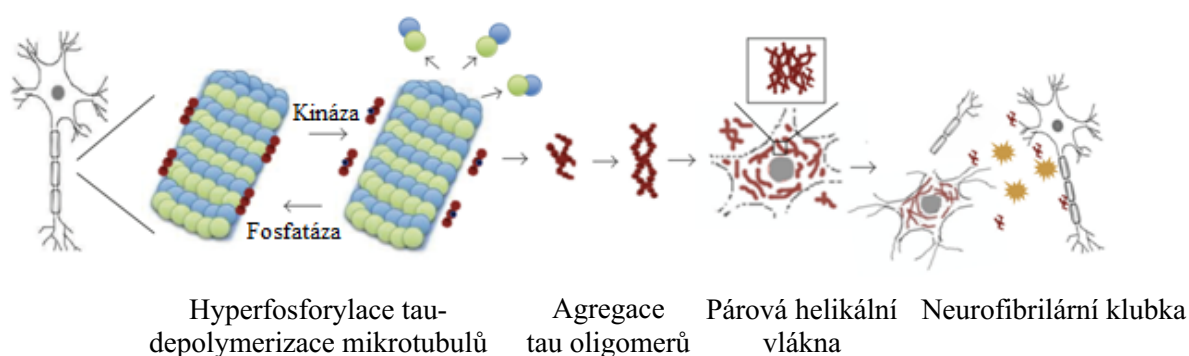
### **Tau protein**

Tau je protein asociovaný s mikrotubuly, který se skládá ze šesti lidských izoformem převážně lokalizovaných v axonu neuronů (Khan and Bloom, 2016). Neuronální a/nebo gliové inkluze tau lze detekovat u několika neurodegenerativních onemocnění nebo „tauopatií“, včetně AN (Irwin, 2016). Neurofibrilární klubka charakteristická pro AN jsou složena primárně z hyperfosforylovaného tau (Lee et al., 1991). Tau patologie typicky začíná v alokortexu mediálního temporálního laloku (entorhinální kůra a hipokampus), než se rozšíří do asociativního izokortexu. Primární senzoričké, motorické a zrakové oblasti bývají relativně ušetřeny (Serrano-Pozo et al., 2011).

Tau je široce exprimován v centrálním a periferním nervovém systému, a proto může být považován za neuronální fosfoprotein. Kromě zapojení tau do udržování neuronální struktury a synaptické plasticity jsou mikrotubuly nezbytné pro axonální transport organel (mitochondrie, endoplazmatické retikulum, lysozomy) a vezikul obsahujících proteiny a neurotransmitery. U neuronů je důležitou součástí cytoskeletu (Kosik, 1993). Interaguje s  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinem a jeho fosforylační stav je kritický pro stabilizaci polymerů tubulinu (Lindwall and Cole, 1984).

Podél axonu a v různých oblastech mozku existuje fosforylační gradient, přičemž distální axon je méně fosforylován, zejména v bílé hmotě (Buée et al., 2000; Hernández and Avila, 2007). Změny ve fosforylačním stavu tau nastávají v procesu remodelace cytoskeletu, ve kterém se regulační mechanismy fosforylace tau stávají kritickými pro podporu synaptické plasticity. Abnormální fosforylace tau negativně ovlivňuje jeho schopnost vázat se na tubulin, což narušuje strukturu mikrotubulů. Kromě toho hyperfosforylovaný tau narušuje axonální transport a synaptický metabolismus, což způsobuje dysfunkce, které vedou ke ztrátě životaschopnosti buněk, a nakonec vedou ke kolapsu mikrotubulárního cytoskeletu a smrti neuronů. Fosforylace a defosforylace tau

na serinových a threoninových fosfoepitopech jsou kritickými regulačními událostmi v neuronální homeostáze. Tau se může nacházet v rozpustné a nerozpustné formě, přičemž druhá z nich je identifikována v párových helikálních vláknech (PHF), která jsou hlavní složkou neurofibrilárních klubek (Obrázek 3). Komplexy PHF-tau mají šest až osm fosfátových skupin na molekulu proteinu tau, což je mnohem vyšší stupeň než obvyklý stupeň fosforylace proteinu tau ve zdravém mozku (tj. dvě fosfátové skupiny na molekulu). U savců bylo popsáno šest izoform tau. Hlavní rozdíly mezi těmito izoformami spočívají v existenci tří nebo čtyř domén vázajících tubulin a některých menších rozdílech na N-konci proteinu (Cleveland and Hoffman, 1991; Trojanowski et al., 1994; Shahani and Brandt, 2002). Tau protein má přibližně 79 fosforylačních míst na serinových a threoninových zbytcích (Shahani and Brandt, 2002).



**Obrázek 3 Tvorba neurofibrilárních klubek.** V neuronu nastává hyperfosforylace proteinu tau – depolymerizace mikrotubulů. Následně nastává agregace tau oligomerů, které se nacházejí v párových helikálních vláknech, které jsou hlavní složkou neurofibrilárních klubek. Dochází ke smrti neuronu a tau oligomery se dostávají do extracelulárního prostoru (upraveno dle Mokhtar et al., 2013).

Hyperfosforylace tau má několik patogenních účinků. Snižuje afinitu tau k mikrotubulům a zvyšuje jeho pravděpodobnost agregace a fibrilace (Sanabria-Castro et al., 2017). To vede k destabilizaci mikrotubulů s následným selháním axonálního transportu a neurodegeneraci, kterou lze kompenzovat nebo korigovat léky stabilizujícími mikrotubuly (Brunden et al., 2010). Předpokládá se, že hyperfosforylace tau způsobuje jeho nesprávnou lokalizaci do somatodendritických kompartmentů, kde interaguje s A $\beta$  a způsobuje synaptotoxicitu prostřednictvím nadměrné aktivace receptorů N-methyl-D-aspartátu (NMDA) (Khan and Bloom, 2016). Kromě toho se



hyperfosforylace tau podílí na A $\beta$ -indukované buněčné smrti, pravděpodobně prostřednictvím toxického zesílení funkčního mechanismu (Fath et al., 2002).

V embryonálních stádiích vývoje je neuronální tau převážně právě v hyperfosforylovaném stavu. To je způsobeno velkou poptávkou po neuroplastických změnách v neuronech a synapsích v časných vývojových stádiích CNS (Lovestone et al., 1997). Ve zralém CNS jsou tau fosfoepitopy udržovány v převážně defosforylovaném stavu, který propůjčuje cytoskeletu nezbytnou stabilitu pro udržení neuronální homeostázy (Johnson and Stoothoff, 2004). Nicméně dynamické změny ve fosforylaci tau jsou důležité pro neuronální reakce, včetně růstu neuritů a synaptické plasticity (Iqbal et al., 2005).

### **Lehká neurofilamenta**

Neurofilamenta jsou intermediární filamenta exprimovaná v neuronech a jsou početně zastoupena právě v axonech. Skládají se ze čtyř podjednotek – lehkého neurofilamenta (NfL), středního neurofilamenta (NfM), těžkého neurofilamenta (NfH) a  $\alpha$ -internexinu v CNS a periferinu v periferním nervovém systému. Neurofilamenta jsou nezbytná pro radiální růst axonů během vývoje, strukturální podporu a přenos elektrických impulsů. Nedávný výzkum naznačuje, že jsou také důležité pro normální synaptickou funkci. Abnormální agregace a další změny neurofilament jsou evidentní u několika neurologických onemocnění včetně AN (Yuan et al., 2012; Yuan et al., 2017).

NfL jsou součástí axonálního cytoskeletu a jsou primárně exprimovány v myelinizovaných axonech velkého kalibru. Změny NfL v tělesných tekutinách byly spojeny s poškozením mozku a atrofií mozku u myších modelů a četnými neurologickými poruchami včetně proteopatických neurodegenerativních onemocnění (Petzold, 2005).

Mozek při AN často vykazuje alespoň střední atrofii struktur limbického laloku. Frontální a temporální kůra vykazuje zvětšení komor a atrofii gyru, zatímco primární motorická a somatosenzorická kůra není ve většině případů AN ovlivněna. Funkční zobrazovací studie zaměřují pozornost na precuneus a zadní cingulární gyrus (Rami et al., 2012). V důsledku výše uvedené atrofie často dochází ke zvětšení čelního a temporálního rohu postranní komory. Pozorován je i pokles hmotnosti mozku. Mediální temporální atrofie postihující amygdalu a hipokampus je obvykle doprovázena zvětšením temporálního rohu, které je pro AN typické. Častá je také ztráta pigmentace neuromelanínu v locus coeruleus (Perl, 2010).

Klinicky se AN typicky primárně projevuje narušením paměti. Pacienti však mohou mít různorodé spektrum příznaků v jiných kognitivních doménách a s různými kognitivními

profily u různých „variant“ AN (např. zadní kortikální atrofie, logopenická primární progresivní afázie a frontální varianta AN). Příznaky AN si okolí pacienta všimne v průměru 3 roky před stanovením diagnózy (Draper et al., 2016). V amnestickém projevu, časné poruchy epizodické paměti odrážejí počáteční patologii v mediálním temporálním laloku. Ve středně těžkých až těžkých stádiích, při šíření patologie do dalších oblastí, dochází k progresivnímu poškození více kognitivních domén, progresivnímu poklesu funkce fungování, narušení behaviorálního projevu, nálady a rostoucí závislosti na druhých při základních činnostech každodenního života. Většina pacientů nakonec vyžaduje celodenní péči. U těch, kteří přežijí v pokročilých stádiích nemoci, je smrt často způsobena následky nemoci a zvýšenou náchylností k pádům, otlakům a infekcím (např. aspirační pneumonie) (Eratne et al., 2018).

Důležité je poznamenat, že u starších věkových skupin může být koncept čisté AN spíše teoretický než realistický. Když se syndrom demence vyskytne později v životě je pravděpodobnější, že je způsoben směsí změn mozku souvisejících s věkem, z nichž nejčastější jsou vaskulární změny, Alzheimerova patologie a patologie  $\alpha$ -synukleinu. V pitevních studiích je ve skutečnosti demence způsobená koincidenčním onemocněním (smíšená patologie) častější než demence způsobená čistou AN (Llewellyn et al., 2008).

### **2.1.2 Onemocnění s Lewyho tělísky**

Syndromy demence spojené s patologií Lewyho tělísek se dělí na demenci s Lewyho tělísky (DLB) a Parkinsonovu nemoc s demencí (PDD). Společně spadají pod tzv. Lewy body diseases či Lewy body demence (LBD). Protože hlavní složkou Lewyho tělísek a Lewyho neuritů je fosforylovaný  $\alpha$ -synuklein, jsou LBD klasifikovány jako  $\alpha$ -synukleinopatie (Kon et al., 2019). LBD je druhou nejčastější příčinou neurodegenerativního onemocnění po AN, bývá ale často nedostatečně diagnostikována, resp. diagnostikována jako jiné onemocnění, nejčastěji jako AN. Podobně jako u AN, i u DLB rozlišujeme časná stádia dle klinického průběhu a tíže symptomů: časným stádiem je porucha chování v REM spánku (*REM sleep behavior disorder*- RBD), která později může progredovat do MCI s Lewy body příznaky (MCI-LB), a následně do syndromu demence při DLB. PN může být v rámci klinické progresy doprovázená MCI (MCI-PN) a někdy také progredovat až do demence (PDD).

#### **$\alpha$ -synuklein**

Klíčovým patologickým rysem u všech těchto poruch je agregace proteinu  $\alpha$ -synukleinu, který tvoří Lewyho tělíčka v tělech neuronů a neuritů (Galasko, 2017).

Fosforylovaný  $\alpha$ -synuklein se také ukládá v axonech a dendritech, kde se objevuje jako vláknité struktury v neuropilu (Lewyho vlákna), tečkovité struktury (Lewyho tečky) a zduřelé axony (Lewyho axony). Tyto struktury se nazývají Lewyho neurity (Saito et al., 2003).  $\alpha$ -synuklein je malý protein (~14 kDa), který je ve vysokých hladinách exprimován neuronovými buňkami, a předpokládá se jeho fyziologická role v synapsích a synaptickém přenosu. Důkazy naznačují, že přeměna  $\alpha$ -synukleinu z rozpustných monomerů na agregované, nerozpustné formy v mozku, je klíčovou událostí v patogenezi synukleinopatií (Mollenhauer et al., 2013). Oligomery  $\alpha$ -synukleinu mají četné toxické účinky včetně tvorby zánětu, synaptické dysfunkce, narušené integrity buněčné membrány a zhoršené degradace intracelulárních proteinů (Ingelsson, 2016). Přibývá důkazů, že  $\alpha$ -synuklein může působit prionovým způsobem, takže špatně složený  $\alpha$ -synuklein může být propagován z buňky do buňky (Brettschneider et al., 2015).

U LBD existují tři varianty, resp. stádia patologie  $\alpha$ -synukleinu: převládající postižení mozkového kmene („brain-stem“), limbická (také nazývaná přechodná) patologie („limbic-predominant“) a neokortikální patologie. Léze mozkového kmene postihují substantia nigra, jádra vagusových a glosfaryngeálních nervů, retikulární jádra a locus coeruleus. Limbická nebo přechodná patologie se vyskytuje v amygdale, transentorhinálním kortexu a gyrus cinguli. Neokortikální patologie postihuje zejména temporální, frontální a parietální kortex. Limbické a neokortikální  $\alpha$ -synukleinové léze jsou spojeny s klinickými (zejména kognitivními) rysy charakteristickými pro LBD, a také odlišují PDD od PN (Toledo et al., 2016). Funkci  $\alpha$ -synukleinu je stále třeba stanovit, avšak podílí se na regulaci synaptické plasticity a neuronální diferenciaci, jakož i na regulaci syntézy dopaminu (Mollenhauer et al., 2013).

Hlavními klinickými otázkami je jednak včasná diagnóza DLB, a následně odlišení DLB od AN. U PDD to je zpravidla jednodušší, začíná hybnou poruchou charakteristickou pro PN, po níž po letech či dokonce desetiletích často následuje kognitivní pokles, resp. mírná kognitivní porucha, tedy MCI-PN (Aarsland et al., 2004). Častým průvodním nálezem LBD (konkomitantní patologií) je však různý stupeň patologie typu AN, tj. A $\beta$  v neuritických placích a hyperfosforylovaný tau v neurofibrilárních klucích (NIA Reagan, 1997). Toto překrývání se mezi dvěma nejběžnějšími, ale přesto odlišnými neurodegenerativními onemocněními, pokud jde o základní patologii a klinické charakteristiky, často činí diagnózu *antemortem* náročnou (Nedelská et al., 2015). Kromě příznaků AN a příznaků PN má DLB výrazné neurobehaviorální a kognitivní rysy (McKeith et al., 1996). Klinické příznaky se dělí na dvě kategorie: základní a podpůrné.

Mezi základní klinické příznaky patří RBD, kolísající stav (zejména co se týká kognice), zrakové halucinace a příznaky parkinsonismu (ztuhlost, zpomalení pohybů, nebo třes). Podpůrné klinické příznaky jsou běžné a mohou se projevit v časném průběhu onemocnění. Patří mezi ne nadměrná spavost, zhoršení čichu, abnormální citlivost k psychiatrickým lékům- neurolepticím, posturální nestabilita, pády, synkopy, těžká autonomní dysfunkce (např. zácpa, ortostatická hypotenze, inkontinence), bludy, apatie, úzkosti či deprese (McKeith et al., 2017).

### **2.1.3 Frontotemporální lobární degenerace**

FTLD je neuropatologický termín pro příbuznou skupinu vzácných neurodegenerativních onemocnění, které způsobují spektrum poruch osobnosti, kognitivních funkcí, řeči a jazyka a motorických funkcí (Boxer et al., 2020). Většinu případů FTLD lze klasifikovat do 2 hlavních podtypů: FTLD-TDP (také známý jako TDP-43) a FTLD-tau.

#### **TDP 43**

Charakteristické patologické znaky související s TDP-43 se obvykle označují jako proteinopatie TDP-43. Zájem o pochopení mechanismů, které jsou základem proteinopatie TDP-43, se v posledním desetiletí podstatně zvýšil, zejména z důvodu přítomnosti proteinopatie TDP-43 jako běžného klíčového patologického znaku v širokém spektru různých neurodegenerativních onemocnění, včetně FTLD. Spojení mezi TDP-43 a neurodegenerativními onemocněními bylo prokázáno počáteční identifikací TDP-43 jako hlavní složky patologického znaku ubikvitin-pozitivních proteinových inkluzí u pacientů s FTLD. Brzy následoval také objev genetických mutací v TDP-43 spojených s FTLD (Gao et al., 2018). Cytoplazmatická agregace ubikvitinovaného, fosforylovaného a zkráceného TDP-43 je sjednocujícím patologickým pozorováním napříč klinickým spektrem FTLD (Neumann et al., 2006). TDP-43 je heterogenní jaderný ribonukleoprotein (hnRNP) o délce 414 aminokyselin. Funkcí TDP-43, podobně jako jiných hnRNP, je regulovat genovou expresi a další aspekty zpracování RNA (Higashi et al., 2013). Narušení správné regulace TDP-43 může přispět k jeho patogenezi. Za fyziologických podmínek je TDP-43 převážně jaderný protein. Ve většině případů FTLD se nachází translokovaný do cytoplazmy, kde tvoří agregáty (Nishimura et al., 2010). Tato inkluzní tělíška TDP-43 se nacházejí v neuronech, neuronálních buněčných procesech a gliích (Neumann et al., 2006). Předpokládá se, že neuronální smrt spojená s patologickým TDP-43 je způsobena kombinací

jak zisku toxické funkce, tak i ztráty fyziologické funkce spojené s deplecí TDP-43 z jádra (Gendron et al., 2011).

Podtypy FTLD-tau zahrnují například nemoc s argyrofilními zrny (AGD), progresivní supranukleární paralýzu (PSP), kortikobazální degeneraci (CBD), Pickovu chorobu (PiD) nebo demenci s převahou neurofibrilárních klubek (Mackenzie et al., 2010). Všechny typy FTLD-tau vedou k syndromu demence, ale případy PSP a CBD se pravděpodobněji ještě před kognitivním deficitem projeví motorickými symptomy (Braak and Braak, 1998a). Celkově FTLD-tau často začíná psychiatrickými příznaky a má podobnosti s jinými neurodegenerativními onemocněními, jako je například AN (Spillantini and Goedert, 2013). Pokud je diagnóza FTLD-tau založena pouze na klinickém nebo histopatologickém posouzení může být náročná, protože inkluze tau jsou přítomny u více neurodegenerativních onemocnění (Cairns et al., 2007).

Mezi AN a FTLD se příznaky značně překrývají. Alzheimerova patologie se projevuje převážně kognitivním poklesem v oblasti paměti, normálním neurologickým vyšetřením a atrofií mozku v oblasti meziotemporálních struktur. Forma progresivní afázie s výraznou anomíí, akalkulií a pauzami při hledání slov je obvykle způsobena Alzheimerovou patologií. S neustálým pokrokem zobrazovacích technik lze použít několik pomocných metod při diagnostice FTLD. Strukturální magnetická rezonance (MRI) a výpočetní tomografie (CT) vykazují vzorce atrofie. FTLD je charakterizována převládající frontální nebo temporální atrofií, přičemž atrofie ve frontoinzulární oblasti je zvláště indikativní právě pro FTLD. PET, funkční magnetická rezonance (fMRI) a CT podobně ukazují v těchto oblastech hypoperfuzi a hypometabolismus (Leo et al., 2021).

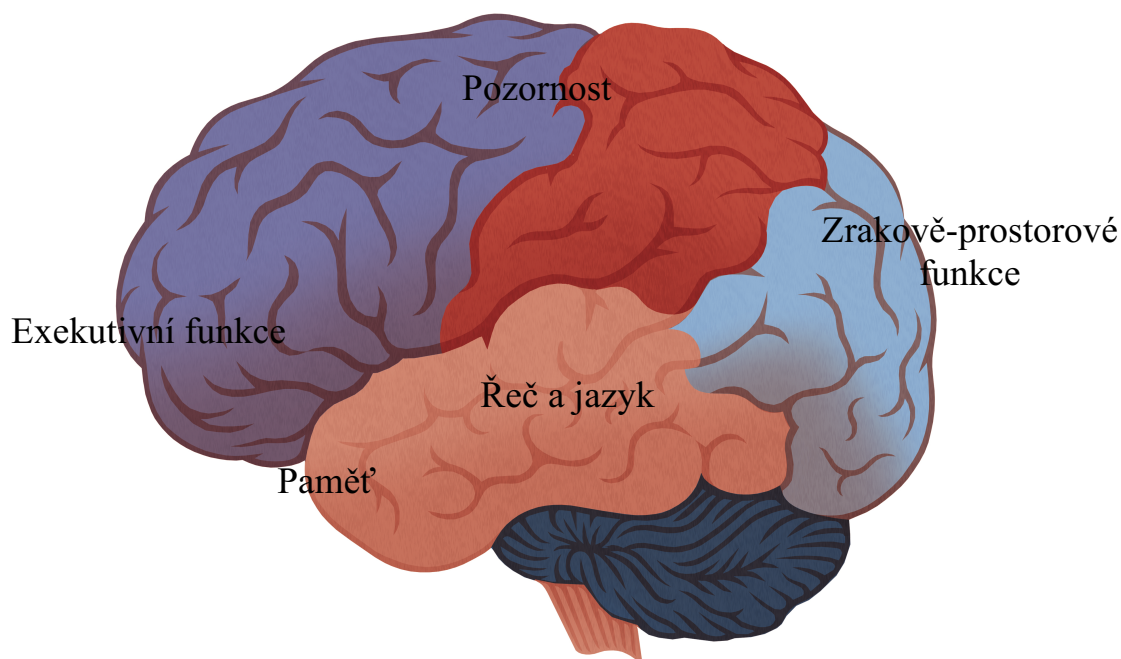
## **2.2 Biomarkery**

Biomarker je charakteristika, kterou lze měřit a vyhodnocovat jako indikátor normálního nebo patologického procesu, nebo pro sledování účinku terapeutických intervencí na specifické biologické kaskády (Wagner, 2009). Ideální diagnostický biomarker neurodegenerativních onemocnění by měl splňovat alespoň tři základní požadavky: (1) odrážet základní neurobiologické změny následující po procesu onemocnění, (2) být validován postmortálními studiemi za předpokladu, že neuropatologické nálezy jsou zlatými standardy, a (3) být měřitelný co nejdříve v kontinuu onemocnění- ideálně v presymptomatických stádiích (NIA, 2011). Biomarkery jsou příslibem pro umožnění účinnějšího vývoje léků a zavedení personalizovaného přístupu medicíny (Hampel et al., 2016), mohou se brzy stát nezbytnými pro stanovení stadia, sledování

a poskytování kvantitativnější kategorizace onemocnění, stejně jako pro dokumentování účinku potenciálních terapeutik. Tyto body jsou zdůrazněny v návrzích pokynů pro rok 2018, které vydal americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) (Časná Alzheimerova choroba: vývoj léků pro léčbu; návrh pokynů pro průmysl) (FDA, 2018) a výbor Evropské lékové agentury (EMA) pro *Medicinal Products for Human Use* (CHMP) (Směrnice pro klinický výzkum léčivých přípravků pro léčbu Alzheimerovy nemoci, 2018).

### **Kognitivní markery**

Kognitivní funkce jsou vyšší funkce mozku, které nám umožňují poznávat a uvědomovat si svět a sobě samých. Vyvíjejí se od narození do dospělosti. Rychlý rozvoj kognitivních funkcí v dětství a adolescenci střídá fázi plató v dospělosti. Především po 60. roce života dochází k jejich postupnému úbytku. Mezi kognitivní funkce patří vnímání, paměť, pozornost, exekutivní funkce, řeč, gnostické funkce, praktické a zrakově-prostorové funkce (Obrázek 4) (Vyhnálek et al., 2020). MMSE je považováno za standardní nástroj kognitivního hodnocení a běžně se používá v rámci procesu diagnostiky neurodegenerativních onemocnění jako screeningový test (Shulman et al., 2006).



*Obrázek 4 Ilustrativní zobrazení kognitivních funkcí a jejich odpovídajících částí mozku (upraveno dle Čechová et al., 2019).*

Paměť je schopnost ukládat, uchovávat a znovuvybavovat informace. Dělí se dle délky trvání na krátkodobou a dlouhodobou a dle charakteru informace na deklarativní a nedeklarativní. U AN se setkáváme s postižením deklarativní paměti. Deklarativní paměť je charakterizována vědomým vybavováním vzpomínek (prožitých událostí a naučených informací). Poruchy paměti nacházíme i u LBD, i když deklarativní paměť je postižena s o něco menší intenzitou než u AN. Naopak velmi výrazná bývá porucha pracovní paměti a pozornosti (Vyhnálek et al., 2020). Exekutivní funkce zahrnují schopnost plánovat, rozhodovat, cílevědomě jednat a řešit problémy (Johanidesová, 2014). Exekutivní funkce úzce souvisí zejména s funkcí frontálního laloku a jeho drah. Kortikální postižení frontálních oblastí je typicky přítomno u FTLD, ale s frontálním syndromem se setkáváme i u pokročilé AN. Pozornost je funkce umožňující v dané chvíli vybrat a upřednostnit relevantní podnět a umožnit jeho zpracování, přičemž dochází i k potlačení ostatních stimulů. Porucha pozornosti také souvisí zejména s funkcí frontálního laloku a jeho drah. Gnoistické funkce zodpovídají za schopnost zpracovávat a interpretovat informace ze zevního prostředí a vlastního těla. Při jejich porušení vzniká agnosie, tedy porucha poznávání. Pacienti

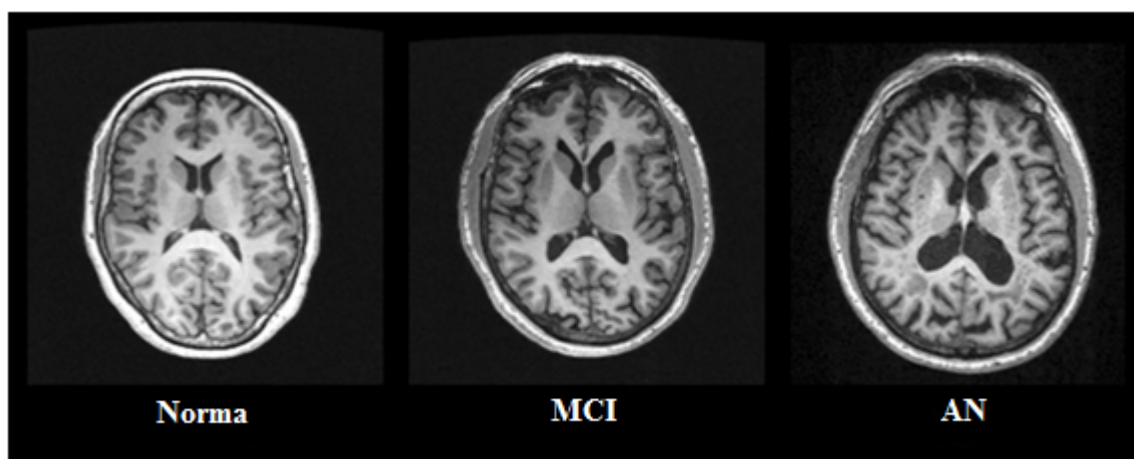
s agnosií jsou schopni vnímat podněty ze zevního prostředí a vlastního těla, ale nejsou schopni je rozpoznat. Agnózie může být zraková, sluchová nebo taktilní. Zrakově-prostorové funkce jsou zodpovědné za vnímání a uvědomování si prostoru a jeho uspořádání, za mentální manipulaci a orientaci v prostoru. Poruchy vizuospeciálních funkcí vznikají při postižení nedominantní hemisféry, v oblasti parietálního laloku. U pacienta s AN se můžeme také setkat s afázií. Je to porucha řeči, která má za následek narušení tvorby a/nebo porozumění řeči. Tito pacienti mohou trpět i apraxií, což je porucha provádění komplexních motorických činností, která není zapříčiněna postižením hybnosti, vnímání, koordinace nebo porozumění řeči a poruchou vědomí (Vyhnálek et al., 2020).

### **Strukturální markery**

Atrofie je nezbytnou progresivní složkou neurodegenerace. Strukturální změny mozku odpovídají předchozím Braakovým stádiím ukládání neurofibrilárních spleť a neuropsychologickým deficitům (Vemuri et al., 2008). MRI je stále jednou z nejpoužívanějších neurovizuálních technik v diagnostice AN. T1-vážené skeny jsou nejčastěji používány kvůli jejich schopnosti poskytnout dobrý kontrast mezi šedou a bílou hmotou a schopnosti odhalit jemné změny v šedé hmotě (Dickerson et al., 2009).

V počátečním stadiu onemocnění AN je atrofie pozorována ve strukturách mediálního temporálního laloku, včetně entorhinálního kortexu a hipokampu. Ve srovnání s kontrolami jsou objemy hipokampů u pacientů s AN sníženy o 26–27 % a objemy entorhinálního kortexu o 38–40 % (Du et al., 2004). Přítomnost difúzní atrofie hipokampu souvisí s deficitem kognitivních funkcí, zejména paměti u pacientů s AN (Oosterman et al., 2012). Při progresi AN atrofii sledujeme i ve zbytku mediálního temporálního laloku, kde dochází ke ztrátě šedé hmoty v mediálním temporálním gyru, parahipokampu, parahipokampálním a fusiformním gyru a temporálním pólu (Obrázek 5) (Li et al., 2011). Při AN jsou ovlivněny i další limbické struktury včetně amygdaly, olfactorius bulbus, cingulate gyrus a thalamus (Guo et al., 2010; Thomann et al., 2009). Atrofie se šíří i do kortikálních oblastí. Frontální, parietální a temporální oblasti mozku zaznamenávají objemové redukce, stejně jako putamen a bazální cholinergní systém předního mozku (Guo et al., 2010; De Long et al., 2008; Kilimann et al., 2014).





Obrázek 5 **Magnetická rezonance.** T1-vážené zobrazení magnetické rezonance (MRI) pomocí sekvence MPRAGE (Magnetisation Prepared Rapid Gradient Echo) ukazuje snížený objem šedé hmoty u pacienta s AN ve srovnání se zdravou kontrolou a střední pokles šedé hmoty u pacienta s MCI (upraveno dle Chandra et al., 2019).

Korelaci biofluidního t-tau a p-tau 181 s atrofií potvrdilo několik studií. Jelikož se předpokládá, že zvýšené hladiny t-tau a p-tau 181 odrážejí poškození neuronů, jsou výsledky snížení hustoty šedé hmoty u jedinců vykazujících zvýšené hladiny t-tau a p-tau 181 v CSF jasným důkazem negativní korelace (Thomann et al., 2009). V studii z roku 2022 Nabizadeh et al. zkoumali asociaci CSF a plazmatických hladin p-tau 181 se strukturálními mozkovými změnami v kortikální tloušťce, kortikálním objemu, povrchové ploše a subkortikálním objemu u pacientů s MCI. Výsledky voxelových parciálních korelačních analýz ukázaly významnou negativní korelaci mezi zvýšenými hladinami plazmatického p-tau 181, celkového tau CSF a CSF p-tau181 se strukturálními změnami v zmíněných oblastech mozku. Tyto výsledky poskytují důkaz pro použití plazmatického p-tau 181 jako diagnostického markeru pro strukturální změny v mozku spojené s časnými stádii AN (Nabizadeh et al., 2022).

### **Biofluidní markery**

Tekuté biomarkery mají potenciál být snadno implementovatelné do klinických studií. Ve stejném vzorku lze analyzovat několik biomarkerů najednou odrážejících různé patofyziologické mechanismy. CSF nebo krev mají potenciál pro detekci některých biomarkerů, které nelze identifikovat zobrazením mozku (Hempel et al., 2010). Ideální biofluidní biomarker by měl být spolehlivý, reprodukovatelný, neinvazivní, snadno

měřitelný a finančně ne příliš nákladný, a také by se měl dát snadno implementovat na velké populace, jako jsou klinické studie a prostředí primární péče (FDA, 2011). Pro úspěšný vývoj léku na AN je důležité zajistit, aby jedinci zařazení do klinických studií byli ti, kteří mají patologii AN a s největší pravděpodobností budou postupovat v průběhu kontinua onemocnění. Tekuté biomarkery mají tak důležitou roli při výběru jedinců do klinického hodnocení (včetně stratifikace jedinců (Hampel et al., 2020)). Kromě toho tekuté biomarkery, zejména krevní biomarkery, by mohly být použity v časném screeningu v primární péči k identifikaci pacientů s AN, čímž by se zlepšila časná diagnostika a umožnilo by se dlouhodobé sledování různých indikátorů onemocnění (Hampel et al., 2018).

CSF představuje logický zdroj pro vývoj biomarkerů u AN vzhledem k jeho přímé interakci s extracelulárním prostorem v mozku, což potenciálně odráží související patofyziologické změny (Blennow et al., 2015). Celkový bezpečnostní záznam lumbální punkce je silně podpořen rozsáhlými metaanalýzami (Engelborghs et al., 2017). Mezi omezení CSF patří relativní invazivita odběru CSF lumbální punkcí, omezený přístup a přijatelnost v některých zemích, nemožnost odebrat vzorky z velkých populací, zejména pokud je potřeba více měření, obavy ze zpomalení nábory jedinců do klinických studií, mezery ve vzdělání o bezpečnosti lumbální punkce, vývoji a validaci CSF testů a klinické užitečnosti (Hampel et al., 2018).

V současnosti jsou do směrnic výzkumu pro AN zahrnuty tři základní biomarkery CSF: A $\beta$ 42, t-tau a p-tau 181 (Dubois et al., 2014). Pro celou trojici biomarkerů bylo Centrem pro výzkum, diagnostiku a léčbu Alzheimerovy demence navrženo stručné označení biochemický či likvorový triplet (Bartoš et al., 2012). Pozitivní likvorový triplet svědčí pro AN se specificitou a senzitivitou až 80-95 %, a to nejen ve fázi demence, ale i v prodromálních stádiích nemoci (Bartoš, 2014).

Pacienti s AN charakteristicky vykazují nízké koncentrace A $\beta$ 42. A $\beta$ 42 je produkován hlavně neurony, secernován do CSF a poté vyčištěn přes hematoencefalickou bariéru a degradován retikuloendoteliálním systémem. Hladiny A $\beta$ 42 jsou tedy regulovány v přísné rovnováze mezi mozkiem, CSF a krví (Shoji et al., 1992). U pacientů s AN tvoří A $\beta$ 42 nerozpustný amyloid, který se kumuluje jako intracerebrální fibrily, což vede ke snížení hladin CSF A $\beta$ 42 (Shoji et al., 2001). Snížené hladiny A $\beta$ 42 v CSF jsou považovány za sekundární k efektu „potopení“ tohoto peptidu do plaků během progresu mozkové amyloidogeneze (Bates et al., 2009).

Kromě A $\beta$ 42 je v lidském CSF přítomno několik dalších A $\beta$  druhů, přičemž A $\beta$ 40 je nejhojnější a nachází se v přibližně 10krát vyšších koncentracích než A $\beta$ 42

(Portelius et al., 2007). V roce 1998 první studie ukázala, že kombinovaná analýza A $\beta$ 42 a A $\beta$ 40 zlepšila diagnostickou přesnost AN (Shoji et al., 1998). Potom mnohé studie ukázaly, že zatímco CSF A $\beta$ 40 nevykazuje žádnou nebo jen malou změnu v AN (Olsson et al., 2016), poměr A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 v CSF má vyšší účinnost při identifikaci AN než CSF A $\beta$ 42 jako samostatný biomarker (Lewczuk et al., 2004; Hansson et al., 2007). Nedávné studie také naznačují, že poměr A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 vykazuje lepší shodu s amyloidní PET pozitivitou (Lewczuk et al., 2017; Janelidze et al., 2016), a tedy že poměr A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 v CSF má vyšší diagnostickou hodnotu. Důvod lepší diagnostické přesnosti poměru A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 je nejasný, ale existuje hypotéza, že CSF A $\beta$ 40 může sloužit jako náhrada pro „celkové“ hladiny A $\beta$ , a tak poměr A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 se normalizuje pro „celkovou“ hladinu produkce A $\beta$  mezi jednotlivci. To znamená, že snížené hladiny A $\beta$ 42 v CSF u jedinců s vysokou celkovou produkcí A $\beta$  lze přesněji identifikovat a okrajově nízká hladina A $\beta$ 42 v CSF u jedinců s nízkou celkovou produkcí A $\beta$  nebude nesprávně interpretována jako indikátor mozkové amyloidózy (Lewczuk et al., 2015).

Tau protein je protein asociovaný s mikrotubuly, primárně lokalizovaný v neuronových axonech, který má díky alternativnímu sestřihu 6 izoform s 352-441 aminokyselinami (Goedert et al., 1989). CSF t-tau byl navržen jako marker odrážející intenzitu neurodegenerace nebo závažnost akutního poškození neuronů (Blennow and Hampel, 2003). Po akutním poškození mozku jsou hladiny t-tau v CSF dynamické, zvyšují se během několika dní po poranění a poté zůstávají zvýšené po týdny až do jejich normalizace (Hesse et al., 2001). Nezávisle na stavu fosforylace byly mírně zvýšené hladiny t-tau v CSF spojeny se stárnutím, vaskulární demencí, roztroušenou sklerózou nebo poraněním hlavy (Shoji et al., 2002). U chronických neurodegenerativních onemocnění jsou nejvyšší hladiny t-tau v CSF zjištěny u onemocnění s nejintenzivnější neurodegenerací, zejména u Creutzfeldt-Jakobovy choroby, kde jsou hladiny 10 až 20krát vyšší než u AN (Riemenschneider et al., 2003). Ve srovnání s kognitivně zdravými kontrolami byl u AN pozorován trojnásobný nárůst t-tau v CSF (Shoji et al., 2002). Systematický přehled biomarkerů CSF pro AN analyzující 41 studií CSF t-tau prokázal jeho 90% specifčnost a 81% senzitivitu při diagnostice onemocnění (Blennow and Hampel, 2003).

Protein p-tau má řadu potenciálních fosforylačních míst a ukázalo se, že abnormální hyperfosforylace ruší normální funkci tau vázat se a stabilizovat mikrotubuly v neuronech, což vede k narušení mikrotubulů, narušení axoplazmatického toku a ztrátě neuronální konektivity. Kromě neurofibrilárních klubek se agregovaný hyperfosforylovaný tau nachází

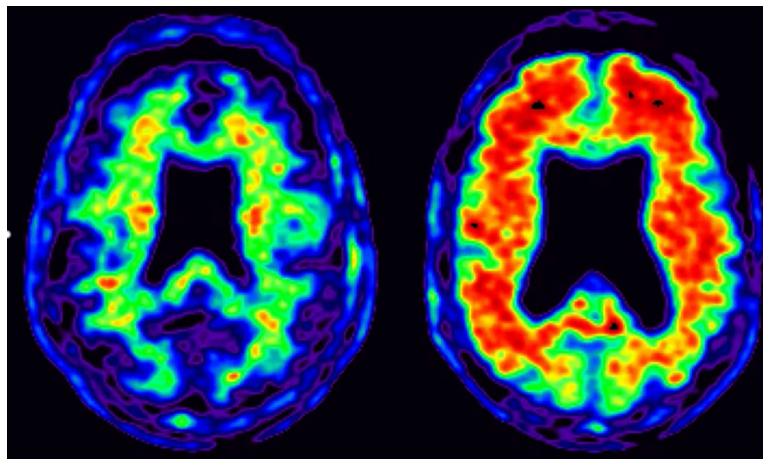
také v neuropilních vláknech a v dystrofických neuritech obklopujících amyloidní plaky (Mandelkow and Mandelkow, 1998). Systematický přehled 11 studií CSF p-tau u AN ukázal diagnostickou specificitu 92 % a senzitivitu 80 % (Blennow and Hampel, 2003). Ve spektru AN vyšší t-tau a p-tau CSF predikují rychlejší klinickou progresi onemocnění (Wallin et al., 2010), což podporuje úlohu t-tau CSF jako biomarkru intenzity neurodegenerace.

Jako nejslibnější fluidní biomarker neurodegenerace se zdá být NfL. Zvýšené hladiny NfL reflektují axonální poškození nebo neuronální degeneraci. Při nich se uvolňuje NfL do intersticiální tekutiny, případně i do CSF a plazmy (Gaiottino et al., 2013). Destrukce axonové membrány tedy uvolňuje neurofilamenta do intersticiální tekutiny, přičemž mezi všemi podjednotkami neurofilament je NfL nejhojnější a nejrozpuštěnější, což z NfL dělá nejměřitelnější podjednotku neurofilament v biologických tekutinách (Petzold, 2005). V roce 1996 průřezová studie zjistila, že koncentrace NfL v CSF se zvyšuje u pacientů s ALS, zejména u pacientů s postižením pyramidálního traktu. Autoři dospěli k závěru, že CSF NfL je slibným biomarkerem neurodegenerace (Rosengren et al., 1996). Hladiny NfL v CSF jsou zvýšeny i při AN, a tedy ještě více při FTLD nebo ALS, ale také po akutním poranění mozku (například cévní mozková příhoda, traumatické poranění mozku nebo srdeční zástava) (Khalil et al, 2018). Výzkumníci začali věnovat pozornost vztahu mezi patologií AN a hladinami NfL. Bylo zjištěno, že nedostatek NfL významně zvýšil patologii axonů kortikální dystrofie, ukládání A $\beta$ , synaptickou fragilitu a mikrogliaální proliferaci kolem A $\beta$  plaků, což naznačuje, že NfL mohou hrát i protektivní roli v patologii AN (Fernandez-Martos et al., 2015). Vzhledem k tomu, že je zvýšen při více neurologických poruchách, NfL jsou považovány za nespecifický marker poškození neuronů (přednostně poškození axonů). Důležité je, že vyšší hladiny NfL jsou spojeny s rychlejší progresí onemocnění a vyšší mírou atrofie mozku u většiny neurodegenerativních poruch. NfL lze tedy považovat za ukazatel míry intenzity probíhající neurodegenerace (Khalil et al, 2018). Výzkumný rámec Národního institutu pro stárnutí a Alzheimerovu asociaci (NIA-AA) z roku 2018 navrhl biologickou definici AN pomocí systému AT(N), kde (N) je otevřen novým biomarkerům, pokud jsou podpořeny dostupnými důkazy (Jack et al., 2018). Studie prokázala, že NfL jako marker neurodegenerativní degenerace (N) se chová podobně jako t-tau (Antonell et al., 2020), a že NfL v kombinaci s t-tau může zlepšit diagnostickou přesnost pacientů s AN (Mattsson et al., 2016).

### 2.3 AT(N) kritéria

AN byla zpočátku definována jako klinicko-patologická jednotka, která je definitivně diagnostikována *post mortem* a během života jako „možná“ nebo „pravděpodobná“ AN (McKhann et al., 1984). Společným tématem doporučení NIA-AA z roku 2011 bylo použití zobrazovacích metod a biomarkerů CSF. U symptomatických jedinců byly biomarkery použity ke zpřesnění diagnózy, že patologické změny AN přispěly ke kognitivním poruchám dané osoby (McKhann et al., 2011).

Schéma (které je označeno AT(N)) rozeznává tři obecné skupiny biomarkerů na základě povahy patologického procesu, který každý reflektuje (Jack Jr. et al., 2016). Biomarkery A $\beta$  plaků (označené „A“) představují kortikální amyloidní PET ligand vázající (Obrázek 6) (Klunk et al., 2004) nebo nízký CSF A $\beta$ 42 (Fagan et al., 2007). Mezi biomarkery fibrilárního tau (označené „T“) patří zvýšená vazba tau fosforylovaného v CSF (p-tau) a kortikálního tau PET ligandu (Buerger et al., 2006). Biomarkery neurodegenerace nebo neuronálního poškození (označené „N“) jsou CSF t-tau (Blennow et al., 2010), hypometabolismus FDG PET a atrofie na MRI (Besson et al., 2015).



Obrázek 6 *Sken amyloidní pozitronové emisní tomografie. Florbetapir u zdravé kontroly (vlevo) a pacienta s Alzheimerovou nemocí (vpravo). Teplé barvy indikují vysokou akumulaci amyloidu beta (převzaté od Lane et al., 2018).*

Nadále se hromadí údaje, které naznačují, že kognitivní pokles u AN probíhá nepřetržitě po dlouhou dobu (Monsell et al., 2014), a že progresse měření biomarkerů je také nepřetržitý proces, který začíná před příznaky (Bateman et al., 2012). Nemoc je tedy nyní považována spíše za kontinuum než za tři odlišné klinicky definované entity (Tabulka 1)

(Dubois et al., 2015). Tento koncept byl uznán, ale nebyl formalizován v pokynech NIA-AA z roku 2011 (Jack Jr. et al., 2011).

*Tabulka 1 Binarizace tří typů biomarkerů AT(N)*

| <b>Profily AT(N)</b> | <b>Kategorie biomarkeru</b>                                   |                 |
|----------------------|---|-----------------|
| <b>A-T-(N)-</b>      | Normální biomarkery AN  |                 |
| <b>A+T-(N)-</b>      | Alzheimerovská patologická změna                              | Kontinuum<br>AN |
| <b>A+T+(N)-</b>      | Alzheimerova nemoc  |                 |
| <b>A+T+(N)+</b>      | Alzheimerova nemoc  |                 |
| <b>A+T-(N)+</b>      | Alzheimerovská a suspektní nealzheimerovská patologická změna |                 |
| <b>A-T+(N)-</b>      | Nealzheimerovská patologická změna                            |                 |
| <b>A-T-(N)+</b>      | Nealzheimerovská patologická změna                            |                 |
| <b>A-T+(N)+</b>      | Nealzheimerovská patologická změna                            |                 |

Poznámky. Binarizace tří typů biomarkerů AT(N) vede k osmi různým profilům biomarkerů. Každý jedinec může být zařazen do jedné ze tří obecných kategorií biomarkerů na základě profilů biomarkerů: osoby s normálními biomarkery AN (bez barvy), osoby s patologickou změnou bez AN (tmavě šedá) a osoby, které jsou v kontinuu AN (světle šedá). Termín „Alzheimerovo kontinuum“ je zastřešující termín, který označuje buď Alzheimerovu patologickou změnu nebo AN (upraveno dle NIA-AA, 2018).

## 2.4 Techniky měření biofluidních markerů

Detekce procesů vznikajících chorob prostřednictvím kvantifikace abnormálních hladin biomarkerů je klíčem k diagnostické a terapeutické intervenci před objevením se sekundárních klinických příznaků a symptomů. Objev a validace biomarkerů proteinů se stala hlavní hnací silou biofarmaceutického výzkumu, cíleného návrhu klinických studií a snahy o včasnou diagnostiku onemocnění (Drucker and Krapfenbauer, 2013).

## **ELISA**

Nejběžnějším nástrojem pro detekci proteinů je imunoanalýza. V současné době je zlatým standardem pro detekci a kvantifikaci proteinů enzymová imunoanalýza *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). V testu ELISA se enzymová značka používá k zesílení signálu tím, že katalyzuje tvorbu mnoha tisíc molekul detekovatelného produktu (Cohen and Walt, 2019). V testech ELISA se úspěšně používá množství různých enzymů, včetně alkalické fosfatázy,  $\beta$ -galaktosidázy, glukoamylázy a ureázy (Hornbeck, 2001). Pro tyto enzymy bylo vyvinuto mnoho různých substrátů a produkty mohou být detekovány pomocí různých detekčních metod včetně kolorimetrické, fluorescenční, chemiluminiscenční a elektrochemické detekce (Cohen and Walt, 2019). Alkalická fosfatáza, možná nejpoužívanější konjugovaný enzym, se doporučuje kvůli její rychlé katalytické rychlosti, vynikající vnitřní stabilitě, dostupnosti, lehké konjugaci a odolnosti vůči inaktivaci běžnými laboratorními činidly. Substráty alkalické fosfatázy jsou navíc netoxické a relativně stabilní (Hornbeck, 2001).

Mezi hlavní výhody ELISA patří schopnost kvantitativně měřit proteiny s relativně vysokou citlivostí, v rozsahu pg/ml a se širokým dynamickým rozsahem. Ačkoli je provedení ELISA poměrně časově náročné, protože zahrnuje relativně dlouhou dobu inkubace a rozsáhlé promývání, je snadné je použít. ELISA se široce používá jak pro klinickou diagnostiku, tak pro základní výzkum. Přístupy ke zlepšení detekce proteinů jsou primárně založeny na zlepšení výkonnosti testů ELISA (Cohen and Walt, 2019).

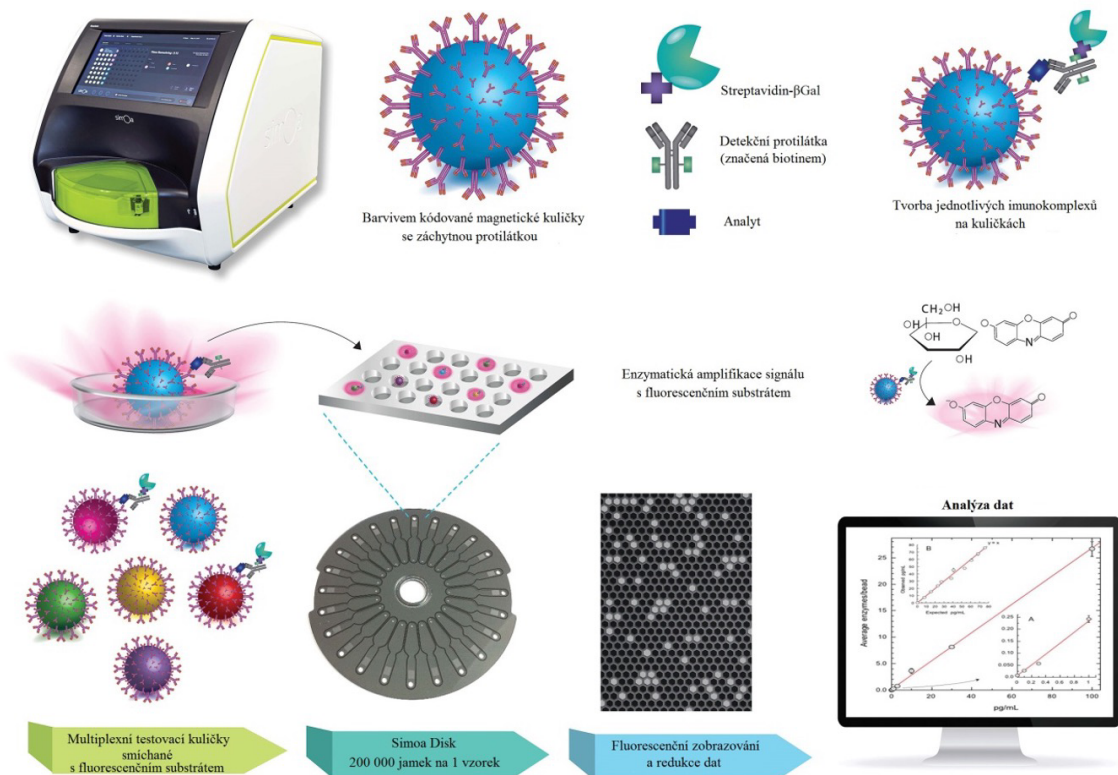
## **Simoa technologie**

Nejběžněji používanou metodou pro měření proteinů v biofluidech je test ELISA, ale tato technika postrádá citlivost k detekci proteinů s nízkou abundancí (Coumans et al., 2017). Schopnost detekovat neurologické biofluidní biomarkery na ultranízkých úrovních, které byly tradičně detekovatelné pouze v CSF, má potenciál změnit způsob diagnostiky poranění a onemocnění mozku (Quanterix, 2022). Simoa technologie je ultrasenzitivní semi-automatizovaná technologie, která dokáže detekovat proteiny v krvi s citlivostí femtogram na mililitr (Li and Mielke, 2019).

Proces Simoa technologie začíná, když se do biologické vzorky přidají standardní paramagnetické částice spojené s protilátkou určenou na vazbu na konkrétní cílový protein. Dále se do roztoku zavedou detekční protilátky obsahující enzym schopný generovat fluorescenční produkt. Cílem je vytvořit amino komplex sestávající z proteinu vázaného

na magnetické kuličky a detekční protilátky. Magnetické kuličky se následně koncentrují magnetickou separací a promyjí, aby se minimalizovalo znečištění (Quanterix, 2022). Na základě Poissonovy statistiky se na každou kuličku naváže jedna nebo žádná molekula cílového proteinu. Pro ilustraci tohoto konceptu, 100  $\mu$ l vzorku krve s 1 fM cílového proteinu obsahuje přibližně 60 000 proteinových molekul. Pokud je se vzorkem krve inkubováno 500 000 kuliček potažených protilátkou, většina kuliček naváže žádné molekuly proteinu, zatímco malý počet kuliček bude vázat jednu molekulu proteinu. Zanedbatelný počet kuliček bude vázat více než jednu molekulu proteinu na základě Poissonovy distribuce (Cohen and Walt, 2019). Pak se přidá enzymový substrát a vzorek se naplní do polí tvořených více než 200 000 mikrojamek, z nichž každá je dostatečně velká na to, aby pojala jen jednu kuličku. Po usazení kuliček se přidá olejový roztok na utěsnění každé jamky a na odstranění přebytečných kuliček. Uzavření jamek a jejich malá velikost jsou rozhodující pro fungování technologie Simoa. Zatímco běžné aminokyseliny vyžadují velké reakční objemy a miliony fluorofor na pozorování signálu, v uzavřených simulátorech jediná cílová molekula rychle generuje dostatek fluorescenčního signálu na lehké měření. Pozitivní jamky jsou automaticky sečteny pro stanovení koncentrace proteinu (Obrázek 7). Simoa technologie se v současnosti používá pro aplikace ve většině terapeutických oblastí, včetně neurologie, onkologie, kardiologie, zánětů a infekčních chorob (Quanterix, 2022).





Obrázek 7 **Proces Simoa technologie.** Paramagnetické kuličky Simoa se používají jako pevná fáze v sendvičovém imunitestě obsahujícím enzymatickou značku. Značené kuličky jsou smíchány s fluorescenčním substrátem a vloženy do řady jamek o velikosti femtolitru na disku Simoa, kde se kuličky usazují do jednotlivých jamek. Jamky jsou utěsněny vrstvou oleje, která zabraňuje kuličkám difundovat z jamek a umožňuje fluorescenčnímu enzymovému produktu akumulovat se ve vysokých koncentracích, což umožňuje detekci jediné molekuly enzymu. K výpočtu koncentrace každého analytu v testu se používá fluorescenční zobrazování a redukce dat (upraveno dle Shan and Wilson, 2017).

### **3 Cíle diplomové práce**

**Cíl diplomové práce I: Stanovit biomarkery v krvi pomocí ultrasenzitivní Simoa TM (*Single molecular assay*) technologie a ověřit jejich vztah k hodnotám v mozkomíšním moku.**

Hypotézy cílu I:

H1: Koncentrace p-tau 181 v plazmě a séru budou odrážet koncentrace p-tau 181 v mozkomíšním moku.

H2: Koncentrace NfL v plazmě a séru budou odrážet koncentrace NfL v mozkomíšním moku.

**Cíl diplomové práce II: Vysledovat vztah mezi krevními biomarkery a kognitivními markery Alzheimerovy nemoci.**

Hypotéza cílu II:

H3: Koncentrace p-tau 181 a NfL v plazmě a séru budou odrážet úroveň kognice daných pacientů měřenou pomocí Mini-Mental State Examination (MMSE).

## 4 Materiál a metody

Diplomový projekt byl zasazen do již dlouhodobého výzkumného projektu Czech Brain Aging Study (CBAS) pod záštitou Kognitivního centra při Neurologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole, které se zaměřuje na studium časných stadií AN a dalších neurodegenerativních onemocnění způsobujících demenci.

CBAS je první velkou prospektivní studií zabývající se neurodegenerativními onemocněními ve východní Evropě. CBAS bylo navrženo ke studiu potenciálních časných biomarkerů a rizikových/ochranných faktorů kognitivního poklesu a demence. Tato studie shromažďuje mnoho informací daných jedinců, které spadají do osobní a rodinné anamnézy, minulého a aktuálního životního stylu nebo informace o genetických, fyzických a biologických markerech. Účastníkům jsou longitudinálně sledové kognitivní funkce a pravidelně dělaná MRI mozku v průběhu času. Česká republika má mezi svými zhruba 10,6 miliony obyvateli přibližně 150 000 pacientů se syndromem demence. CBAS bylo založeno pomocí náboru jedinců ze dvou kognitivních center na dvou nezávislých neurologických odděleních sídlících ve fakulturních nemocnicích v Praze a Brně. Hlavním cílem obou center je diagnostika a léčba neurologických poruch, které vedou ke kognitivním poruchám a demenci. Obě centra jsou sladěna v oblasti neuropsychologie, multimodalitního MRI, PET zobrazování, genetického testování, krevních testů a analýzy CSF, sady dotazníků a databázového systému. Všichni účastníci vstupující do kognitivního centra podstupují neurologické vyšetření, CT nebo MRI mozku a kognitivní vyšetření, s výjimkou subjektů s demencí (Sheardova et al., 2019).

### 4.1 Výzkumný soubor

Do studie bylo celkem zahrnuto 75 jedinců z Czech Brain Ageing Study, včetně kognitivně zdravých kontrol (n= 14), jedinců ve stádiu MCI (n= 34) a jedinců ve stádiu demence (n= 27). Účastníci této studie byli vybráni na základě dostupnosti vzorků CSF, plazmy a séra. Demografické údaje účastníků studie jsou popsány v Tabulce 2. Do diplomové práce byly zařazeni pacienti s různou etiologií- AN, FTLD nebo LBD, protože cílem je sledování možného vztahu mezi hodnotami plazmových a sérových biomarkerů s markery v CSF. Data pacientů a výsledky vyšetření byla anonymizována v souladu s GDPR a Etickou komisí. Data jsou ukládána v zabezpečené databázi Redcap

zpětně od roku 2011 v rámci CBAS. Tímto způsobem byla archivována i aktuální data získaná v rámci diplomového projektu.

*Tabulka 2 Demografické údaje všech jedinců zahrnutých do diplomové práce*

|                 | <b>Kontrola</b> | <b>MCI</b>   | <b>Demence</b> |
|-----------------|-----------------|--------------|----------------|
|                 | <b>n= 14</b>    | <b>n= 34</b> | <b>n= 27</b>   |
| <b>Žena/Muž</b> | 9/5             | 14/20        | 16/11          |
| <b>Věk</b>      | 61,6 (8,7)      | 72,4 (9,1)   | 72,7 (7,8)     |
| <b>Vzdělání</b> | 15,4 (3,3)      | 14,5 (2,9)   | 13,8 (2,9)     |

Poznámky. Hodnoty věku a vzdělání jsou prezentovány jako průměry všech hodnot, hodnoty pohlaví představují počty jedinců daného pohlaví. SD= Směrodatná odchylka, MCI= mírná kognitivní porucha.

### **Vyšetření kognice**

Na testování kognice se v rámci CBAS používá jako jeden z mnoha i test MMSE, který se skládá z 30 otázek a 11 subtestů, které pokrývají pět domén- orientace, rozsah pozornosti, koncentrace/pracovní paměť, verbální paměť a řeč a praxe. Mezi testované úlohy patří například orientace s časem, místem, vybavení 3 slov z paměti, pojmenování 2 předmětů nebo překreslení obrazce. Zrakově prostorové funkce jsou hodnoceny minimálně a chybí subtest mapující exekutivní funkce (Štěpánková et al., 2015). Každá správná odpověď znamená jeden bod. V testu je možné dosáhnout maximálně 30 bodů, přičemž hodnocení testu je následovné: 27-30 bodů představuje výsledek pro normu bez poruchy kognitivních funkcí, přičemž při spodní hranici je vhodné další testování; 25-26 pro hraniční stav, podezření na MCI, doporučeno je další neuropsychologické vyšetření; 18-24 pro lehkou demenci; 12-17 pro středně těžkou demenci; 0-11 pro těžkou demenci.

Diplomový projekt probíhal v Kognitivním centru Neurologické kliniky 2. LF a FN Motol, které se již dlouhodobě zabývá výzkumem a klinickým sledováním pacientů s AN. V Kognitivním centru probíhá longitudinální sledování pacientů v rámci CBAS od roku 2011. Pro účel diplomové práce byl tedy zajištěn dostatečný počet pacientů (koncentrace p-tau 181 v CSF, plazmě a séru byly změřeny 72 pacientům, koncentrace NfL v CSF, plazmě a séru byly změřeny 22 pacientům), vhodné zázemí pro jejich testování a odběr biologických materiálů, a laboratoř pro analýzu vzorků, ve které byla využívána

metoda ELISA a Simoa technologie. K dispozici byly i výsledky kognitivních vyšetření, konkrétně testu MMSE.

#### **4.2 Stanovení koncentrace biomarkerů v CSF pomocí metody ELISA**

Vzorky CSF byly odebrány a analyzovány v rámci studie CBAS. Odběr a uchovávání CSF se provádí podle široce uznávaného konsenzuálního protokolu pro standardizaci odběru CSF a biobankingu (Vanderstichele et al., 2012). Pro každého účastníka je uloženo 18 alikvotů 0,2 ml CSF a 9 alikvotů séra a plazmy. Všechny vzorky jsou skladovány při -80 °C. CSF p-tau 181 a NfL byly analyzovány pomocí EUROIMMUN (EI) ELISA (EUROIMMUN AG, Lübeck, Německo) podle pokynů od výrobce.

#### **4.3 Stanovení koncentrace biomarkerů v plazmě a séru pomocí Simoa technologie**

Vzorky plazmy odebrané do zkumavky s příslušnou antikoagulační látkou- kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA) byly rozděleny na alikvoty a zmrazeny na -80 °C podle standardních postupů. Vzorky séra byly odebrány do zkumavky bez antikoagulační látky, rozděleny na alikvoty a zmrazeny na -80 °C podle standardních postupů.

Před analýzou biomarkerů byly vzorky krve skladovány při -80 °C rozmrazeny, protřepány na vortexu a centrifugovány při 10 000 x g po dobu 5 minut. 1 hodinu před začátkem měření byly rozmrazeny i všechny reagenty. Analýza plazmy a séra se uskutečnila na analyzátoru SR-X (Quanterix) v Likvorovém laboratoriu Ústavu imunologie 2. LF UK a FN Motol. K analýze plazmového a sérového p-tau 181 byl použit komerčně dostupný kit Simoa p-tau 181 Advantage V2 Kit. Systém SR-X se skládá ze 3 částí- promývačky, třepačky a samotného analyzátoru. Před začátkem měření byla promývačka a třepačka připravena- systém promývačky byl propláchnut a třepačka nastavena na určitou teplotu a rychlost třepání (při p-tau 181 i NfL je to 30 °C a 800 RPM). Po přípravě nastalo pipetování vzorků, které byly ředěné 1:4- 25 µl vzorku se přidalo do 75 µl ředidla pro vzorky. Stejný postup byl opakován i při kontrolách dodaných od výrobce v balení kitu. Kalibrátory byly přidány nezředěné, 100 µl do jedné jamky. Vzorky, kontroly i kalibrátory byly měřeny v dubletech. Činidlo RGP bylo vloženo do držáku na třepačce a třepané až do samotného měření na analyzátoru. Magnetické kuličky byly vortexovány 30 sekund a následně přidány do každé jamky v objemu 25 µl. Magnetické kuličky musí být na mikroplotýnku přidány do 2 minut, aby se předešlo jejich usazení v dolní části rezervoáru. Dalším krokem bylo přidání detektoru, jehož 20 µl bylo přidáno do každé jamky. Následně byly vzorky s magnetickými kuličkami a detektorem inkubovány po dobu 20 minut,

při 30 °C a 800 RPM. Po inkubaci byla mikroplotýnka se vzorky přesunuta na promývačku, kde nastalo první promytí s 2-step protokolem. Po promytí zůstala mikroplotýnka na magnetu, přidán byl roztok SBG a následovala inkubace magnetických kuliček s SBG v trvání 10 minut při 30 °C a 800 RPM. Po inkubaci byla mikroplotýnka přesunuta na promývačku, kde nastalo druhé promývání. Po něm byla mikroplotýnka přemístěna na třepačku v trvání 1 minuty při 30 °C a 800 RPM, následovalo vrácení mikroplotýnky na promývačku, kde došlo k resuspendování vzorků. Takto připravená mikroplotýnka byla následně 10 minut sušena na magnetu v promývačce. V této době byl do analyzátoru importován protokol pro analýzu (p-tau 181 Advantage V2), připraveno rozložení plotýnky, doplněné špičky, disky a vyprázdňeny koš. Vysušená mikroplotýnka byla i s činidlem RGP přidána do analyzátoru, po čem následovala přibližně dvouhodinová analýza a po ní vyhodnocení získaných dat.

K analýze plazmového a sérového NfL byl použit komerčně dostupný kit Simoa NF light Advantage (SR-X) Kit. Vzorky, kalibrátory a kontroly dodané od dodavatele byly totéž testovány v duplikátech. Postup měření byl stejný s jedinou změnou- inkubace vzorků, magnetických kuliček a detektoru trvala 30 minut při 30 °C a 800 RPM. Do analyzátoru byl importován NF-light protokol.

#### **4.4 Statistická analýza**

Analýza získaných dat koncentrací p-tau 181 a NfL v plazmě, séru a CSF byla prováděna pomocí statistického programu R. Ke kontrole normálního rozdělení dat byl použit Shapiro-Wilkův test. Jelikož data nebyla normálně rozdělena, byl k popisu síly a směru lineárního vztahu mezi dvěma kvantitativními proměnnými (tedy ke korelaci) použit Spearmanův korelační koeficient. Je to neparametrický korelační koeficient, který je robustní vůči odlehlým hodnotám a odchylkám od normality. Korelace byla sledována mezi těmito proměnnými:

- a) Koncentrace p-tau 181 v CSF a v plazmě,
- b) Koncentrace p-tau 181 v CSF a v séru,
- c) Koncentrace p-tau 181 v plazmě a séru,
- d) Koncentrace NfL v CSF a v plazmě,
- e) Koncentrace NfL v CSF a v séru,
- f) Koncentrace NfL v plazmě a séru.

Možnou korelaci jsme sledovali i mezi koncentracemi p-tau 181 a NfL v plazmě a séru a číselným hodnocením výsledků jednotlivců v MMSE testu. I tady jsme používali Spearmanův korelační koeficient.

## 5 VÝSLEDKY

NfL byly měřeny celkem 22 jedincům. Průměrný věk všech jedinců, kterým byly NfL změřeny, byl 71,6 let. Průměrný počet let vzdělání všech jedinců, kterým byly NfL měřeny, byl 14,2. V kontrolní skupině byli 4 jedinci, ve skupině MCI 10 a ve skupině demence 8. Průměrný věk v kontrolní skupině byl 62 let, ve skupině MCI 72,5 a ve skupině demence 75,3. Průměrný počet let vzdělání byl v kontrolní skupině 18 let, ve skupině MCI 14,5 let a ve skupině demence 13,3. Průměrné koncentrace CSF NfL byly 730,8 pg/ml u kontrolní skupiny, 1043,2 pg/ml u MCI a 1433,5 pg/ml u demence. Průměrné koncentrace NfL v plazmě byly 8,1 pg/ml u kontrolní skupiny, 17,9 pg/ml u MCI a 25,3 pg/ml u demence. Průměrné hodnoty koncentrací sérového NfL byly 10,1 pg/ml u kontrolní skupiny, 21,4 pg/ml u MCI a 30,9 pg/ml u demence. Demografické charakteristiky jsou prezentovány v Tabulce 3.

*Tabulka 3 Demografické údaje pacientů, kterým byly měřeny NfL*

|                     | <b>Kontrola<br/>n= 4</b> | <b>MCI<br/>n= 10</b> | <b>Demence<br/>n= 8</b> |
|---------------------|--------------------------|----------------------|-------------------------|
| <b>Žena/Muž</b>     | 3/1                      | 5/5                  | 4/4                     |
| <b>Věk</b>          | 62,0 (3,1)               | 72,5 (7,8)           | 75,3 (4,4)              |
| <b>Vzdělání</b>     | 18,0 (0,0)               | 14,5 (2,2)           | 13,3 (2,1)              |
| <b>CSF NfL</b>      | 730,8 (303,7)            | 1043,2 (377,8)       | 1433,5 (1254,8)         |
| <b>Plazmové NfL</b> | 8,1 (0,9)                | 17,9 (6,2)           | 25,3 (11,6)             |
| <b>Sérové NfL</b>   | 10,1 (2,0)               | 21,4 (7,9)           | 30,9 (15,6)             |

Poznámky. Hodnoty věku, vzdělání a koncentrací CSF, plazmového a sérového NfL jsou prezentovány jako průměry všech hodnot, hodnoty pohlaví představují počty jedinců daného pohlaví. Koncentrace NfL jsou uváděny v pg/ml. SD= směrodatná odchylka, MCI= mírná kognitivní porucha.

p-tau 181 byl měřen celkem 72 jedincům. Průměrný věk všech jedinců, kterým byl p-tau 181 změřen, byl 75 let. Průměrný počet let vzdělání všech jedinců, kterým byl p-tau 181 měřen, byl 14,3. V kontrolní skupině bylo 14 jedinců, ve skupině MCI 32 a ve skupině demence 26. Průměrný věk v kontrolní skupině byl 61,6 let, ve skupině MCI 72,8 a ve skupině demence 72,4. Průměrný počet let vzdělání byl v kontrolní skupině 16,6 let, ve skupině MCI 14,6 let a ve skupině demence 13,5. Průměrné koncentrace CSF p-tau 181 byly 43,6 pg/ml u kontrolní skupiny, 123,6 pg/ml u MCI a 111,7 pg/ml u demence. Průměrné koncentrace p-tau 181 v plazmě byly 1,6 pg/ml u kontrolní skupiny, 2,9 pg/ml



u MCI a 3,3 pg/ml u demence. Průměrné hodnoty koncentrací sérového p-tau 181 byly 1,1 pg/ml u kontrolní skupiny, 2,0 pg/ml u MCI a 2,1 pg/ml u demence. Demografické charakteristiky jsou prezentovány v Tabulce 4.

*Tabulka 4 Demografické údaje pacientů, kterým byl měřen p-tau 181*

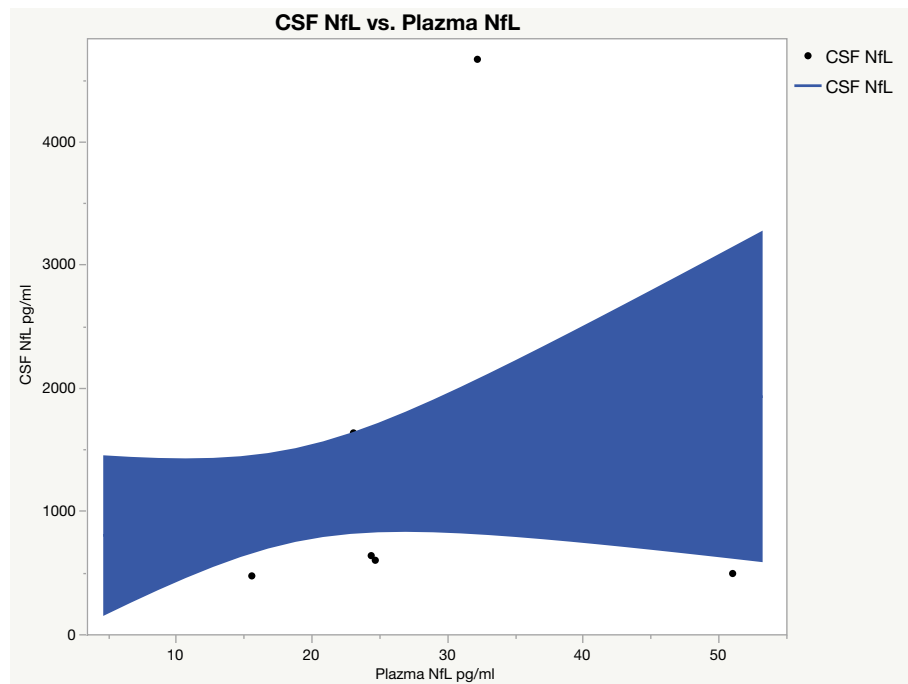
|                           | <b>Kontrola<br/>n= 14</b> | <b>MCI<br/>n= 32</b> | <b>Demence<br/>n= 26</b> |
|---------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------|
| <b>Žena/Muž</b>           | 9/5                       | 13/19                | 15/11                    |
| <b>Věk</b>                | 61,6 (8,7)                | 72,8 (8,8)           | 72,4 (7,8)               |
| <b>Vzdělání</b>           | 16,6 (2,6)                | 14,6 (3,2)           | 13,5 (2,5)               |
| <b>CSF p-tau 181</b>      | 43,6 (60,4)               | 123,6 (214,1)        | 111,7 (84,2)             |
| <b>Plazmový p-tau 181</b> | 1,6 (1,1)                 | 2,9 (1,3)            | 3,3 (2,5)                |
| <b>Sérový p-tau 181</b>   | 1,1 (0,7)                 | 2,0 (1,2)            | 2,1 (1,4)                |

Poznámky. Hodnoty věku, vzdělání a koncentrací CSF, plazmového a sérového p-tau 181 jsou prezentovány jako průměry všech hodnot, hodnoty pohlaví představují počty jedinců daného pohlaví. Koncentrace p-tau 181 jsou uváděny v pg/ml. SD= směrodatná odchylka, MCI= mírná kognitivní porucha.

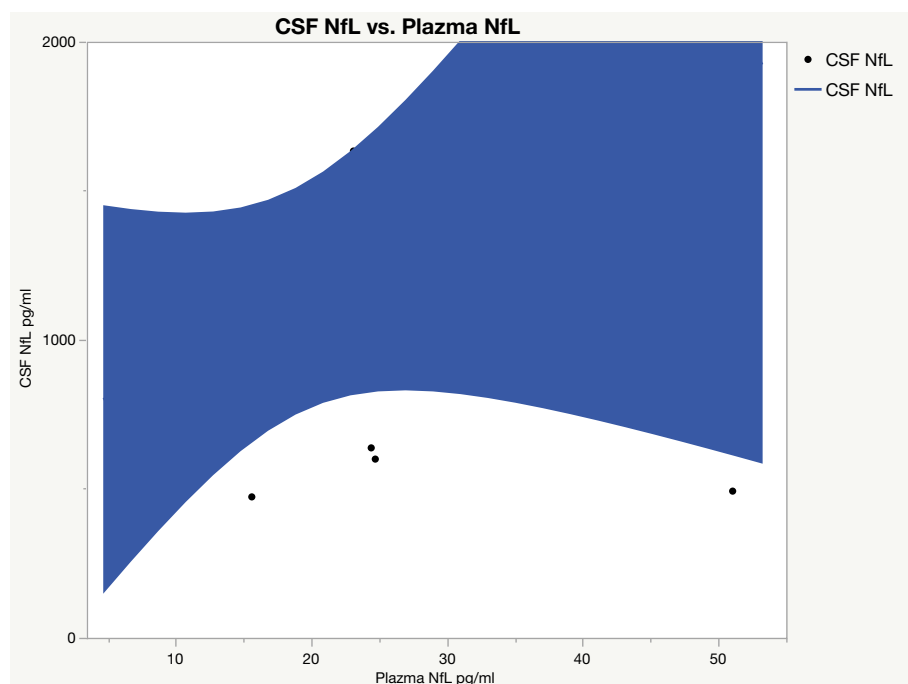
#### **Korelace koncentrace NfL v CSF, plazmě a séru**

Po použití Shapiro-Wilkova testu bylo zjištěno, že data nebyla normálně rozdělena. Proto byl k ověření možné korelace mezi hodnotami koncentrací NfL v CSF, plazmě a séru použit Spearmanův korelační koeficient. Naše hladina významnosti alpha byla nastavena na hodnotu  $\alpha= 0,05$ . Na sledování síly korelace byl používán koeficient rs. Pozitivní nebo negativní hodnoty od 0,00 do 0,19 představovali velmi slabou korelaci, hodnoty od 0,20 do 0,39 slabou korelaci, hodnoty od 0,40 do 0,69 mírnou korelaci, hodnoty od 0,70 do 0,89 silnou korelaci, a nakonec hodnoty od 0,90 do 1,00 velmi silnou korelaci.

Při sledování koncentrace NfL v CSF a plazmě vyšla hodnota  $P= 0,1892$  což znamená, že přijímáme naši nulovou hypotézu, že mezi koncentracemi NfL v CSF a plazmě není vztah (Graf 1 a 2). Spearmanův korelační koeficient (rs) vyšel 0,2908 z čehož také vyplývá, že mezi koncentrací NfL v CSF a plazmě je jenom velmi slabý pozitivní vztah.

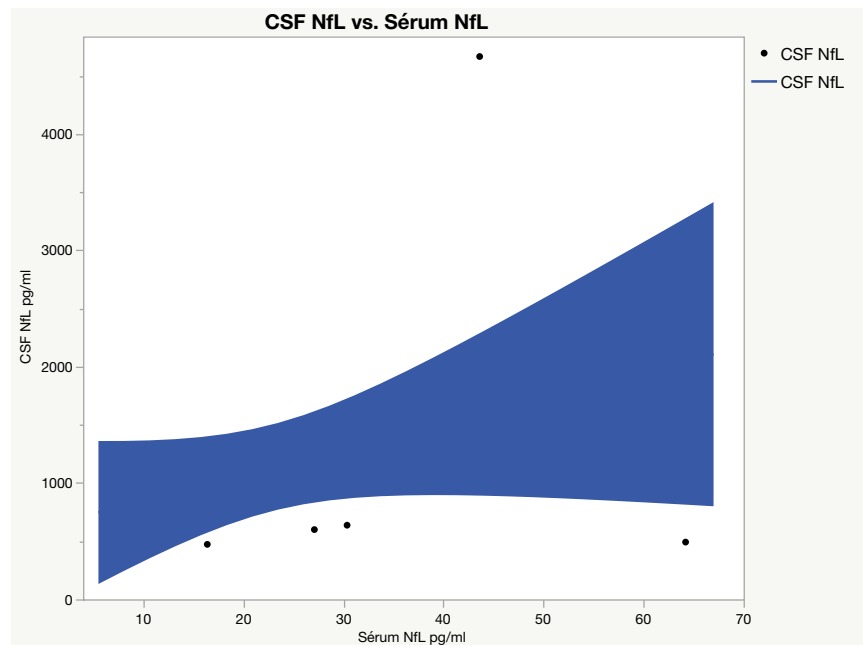


*Graf 1 Korelace koncentrace NfL v CSF a plazmě (všechny hodnoty). Koncentrace NfL jsou udávány v pg/ml.  $P=0,1892$ ,  $r_s= 0,2908$ .*

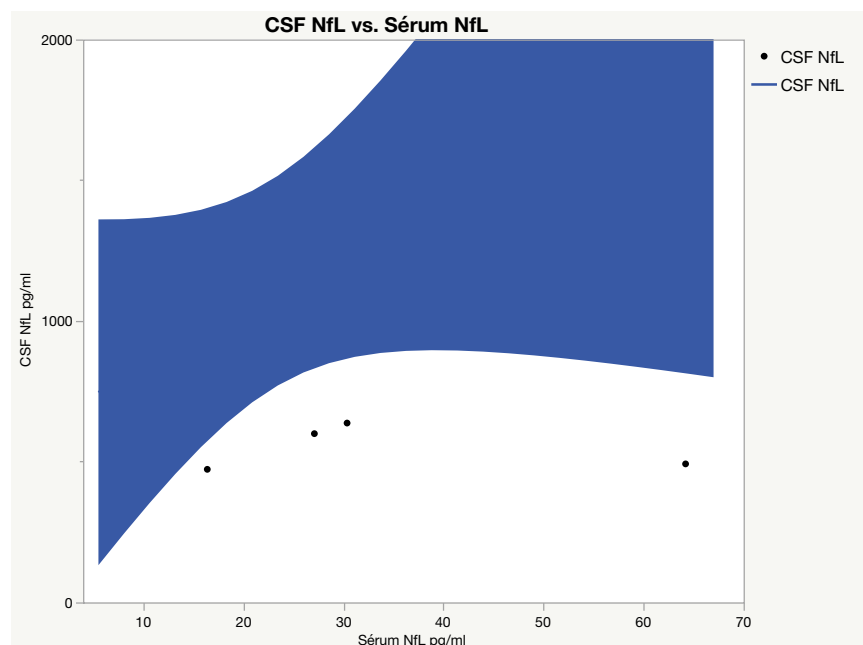


*Graf 2 Korelace koncentrace NfL v CSF a plazmě (menší rozsah hodnot). Koncentrace NfL jsou udávány v pg/ml.  $P=0,1892$ ,  $r_s= 0,2908$ .*

Při sledování koncentrace NfL v CSF a séru vyšla hodnota  $P=0,0968$  což znamená, že přijímáme nulovou hypotézu, že ani při koncentracích NfL v CSF a séru není vztah (Graf 3 a 4). Spearmanův korelační koeficient ( $r_s$ ) vyšel 0,3631 z čehož také vyplývá, že mezi koncentrací NfL v CSF a plazmě je jenom velmi slabý pozitivní vztah.

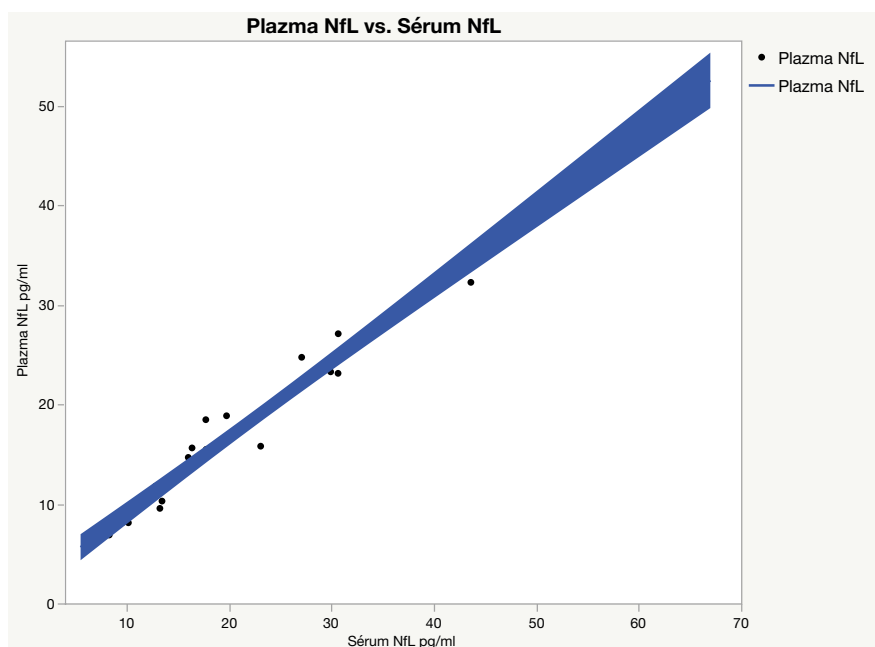


**Graf 3 Korelace koncentrace NfL v CSF a séru (všechny hodnoty).** Koncentrace NfL jsou udávány v pg/ml.  $P=0,0968$ ,  $r_s=0,3631$ .

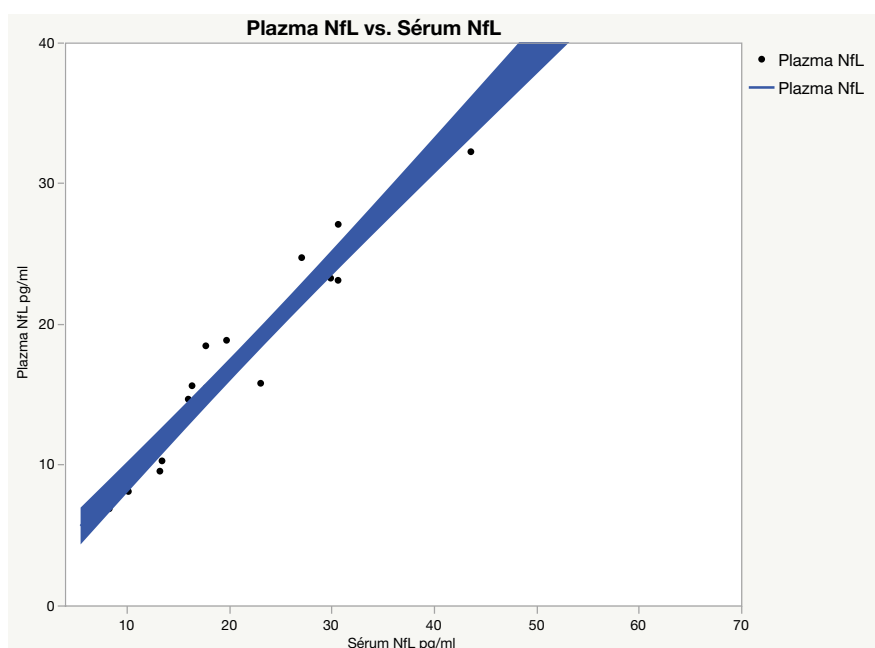


**Graf 4 Korelace koncentrace NfL v CSF a séru (menší rozsah hodnot).** Koncentrace NfL jsou udávány v pg/ml.  $P=0,0968$ ,  $r_s=0,3631$ .

Při sledování koncentrace NfL v plazmě a séru vyšla hodnota  $P < 0,0001$  což znamená, že zamítáme nulovou hypotézu. Mezi koncentracemi NfL v plazmě a séru vztah existuje. Spearmanův korelační koeficient ( $r_s$ ) vyšel 0,9695 z čehož také vyplývá, že mezi koncentrací NfL v plazmě a séru je velmi silná pozitivní korelace (Graf 5 a 6).



**Graf 5 Korelace koncentrace NfL v plazmě a séru (všechny hodnoty).** Koncentrace NfL jsou udávány v pg/ml.  $P < 0,0001$ ,  $r_s = 0,9695$ .

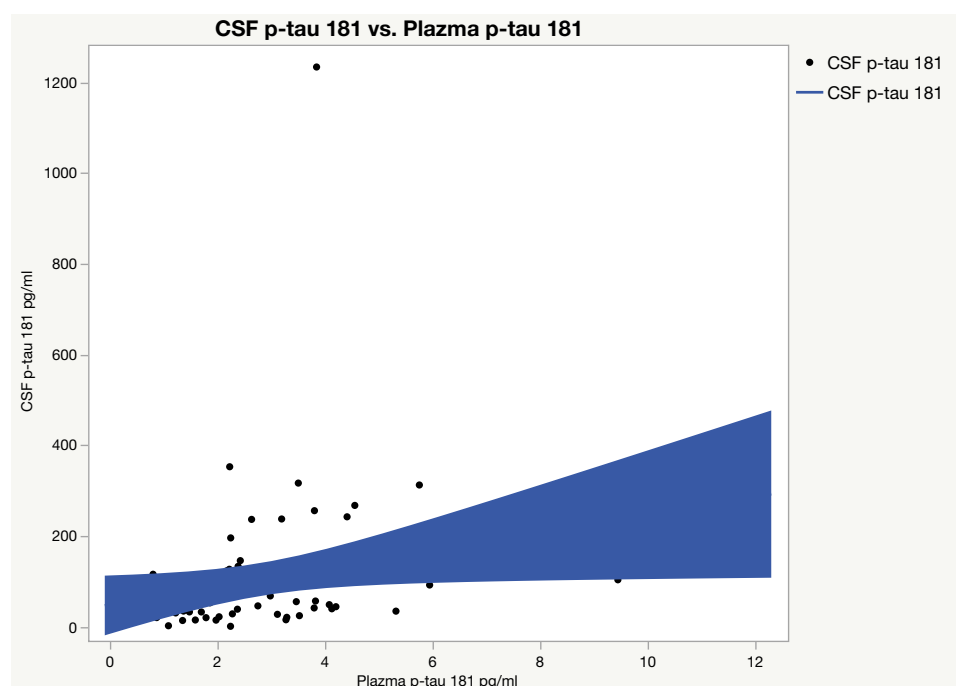


**Graf 6 Korelace koncentrace NfL v plazmě a séru (menší rozsah hodnot).** Koncentrace NfL jsou udávány v pg/ml.  $P < 0,0001$ ,  $r_s = 0,9695$ .

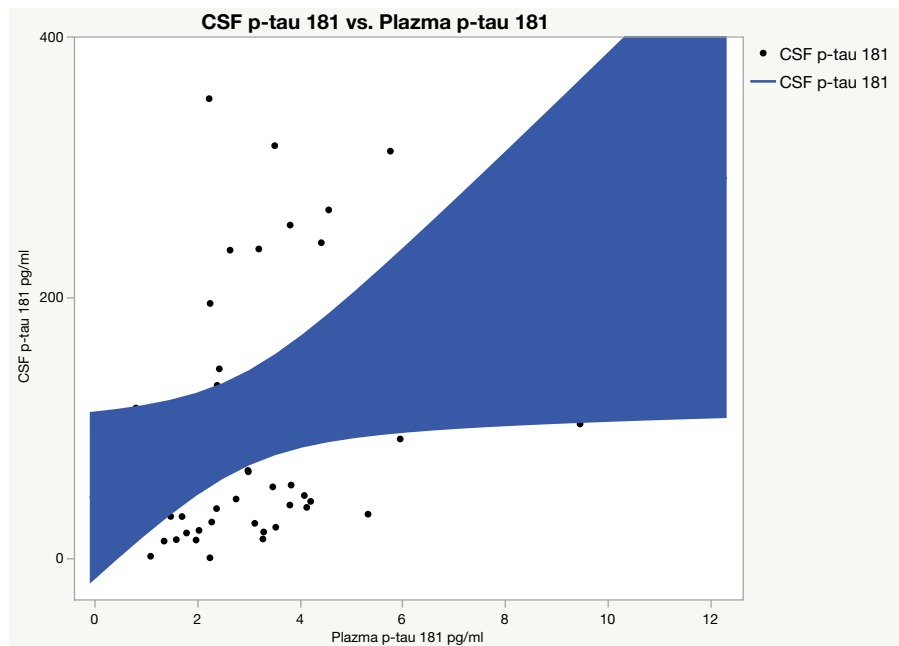
### Korelace koncentrace p-tau 181 v CSF, plazmě a séru

Po použití Shapiro-Wilkova testu bylo zjištěno, že data nebyla normálně rozdělena. Proto byl k ověření možné korelace mezi hodnotami koncentrací p-tau 181 v CSF, plazmě a séru použit Spearmanův korelační koeficient. Naše hladina významnosti alpha byla nastavena na hodnotu  $\alpha = 0,05$ . Na sledování síly korelace byl používán koeficient rs. Pozitivní nebo negativní hodnoty od 0,00 do 0,19 představovali velmi slabou korelaci, hodnoty od 0,20 do 0,39 slabou korelaci, hodnoty od 0,40 do 0,69 mírnou korelaci, hodnoty od 0,70 do 0,89 silnou korelaci, a nakonec hodnoty od 0,90 do 1,00 velmi silnou korelaci.

Při sledování koncentrace p-tau 181 v CSF a plazmě vyšla hodnota  $P < 0,0001$  což znamená, že zamítáme nulovou hypotézu, že mezi koncentracemi p-tau 181 v CSF a plazmě neexistuje vztah. Spearmanův korelační koeficient (rs) vyšel 0,4737, tedy mezi hodnotami p-tau 181 v CSF a plazmě sledujeme mírnou korelaci (Graf 7 a 8).

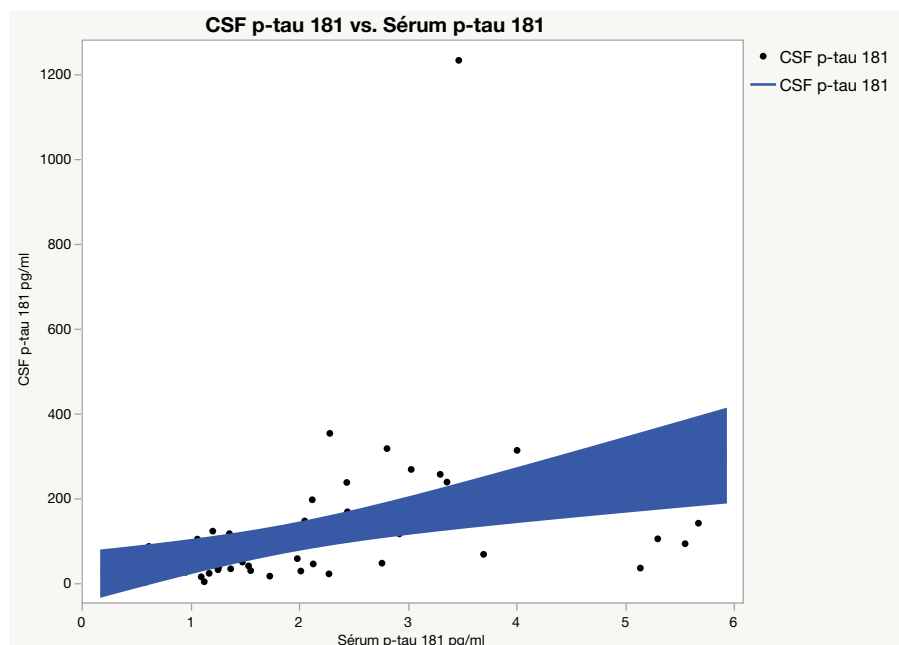


**Graf 7 Korelace koncentrace p-tau 181 v CSF a plazmě (všechny hodnoty).** Koncentrace p-tau 181 jsou udávány v pg/ml.  $P < 0,0001$ ,  $rs = 0,4737$ .

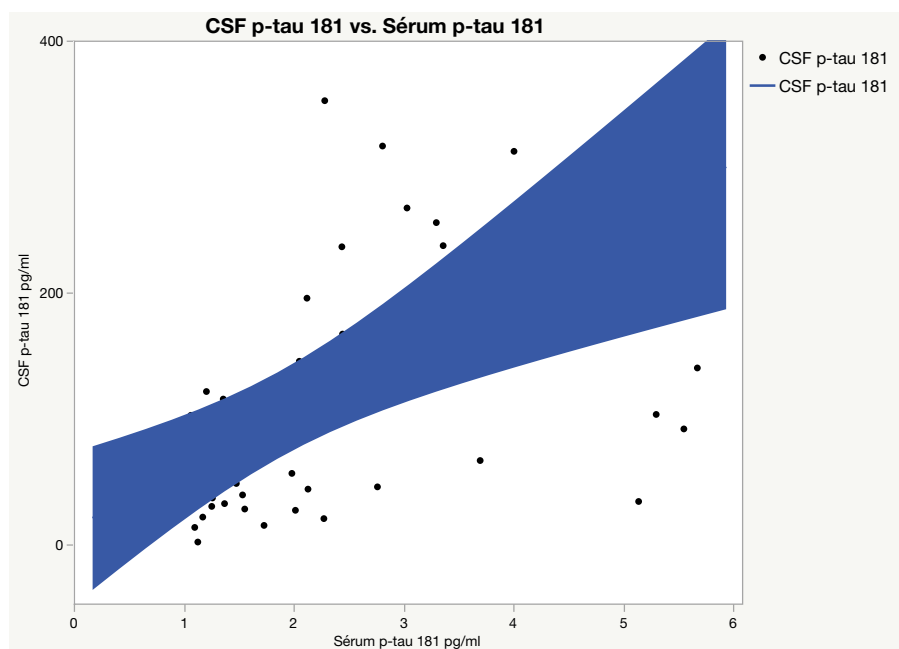


**Graf 8 Korelace koncentrace p-tau 181 v CSF a plazmě (menší rozsah hodnot).** Koncentrace p-tau 181 jsou udávány v pg/ml.  $P < 0,0001$ ,  $r_s = 0,4737$ .

Při sledování koncentrace p-tau 181 v CSF a séru vyšla hodnota  $P < 0,0001$ , zamítáme tedy nulovou hypotézu, že mezi koncentracemi p-tau 181 v CSF a séru není vztah. Spearmanův korelační koeficient ( $r_s$ ) vyšel 0,6308, což představuje mírnou korelaci (Graf 9 a 10).

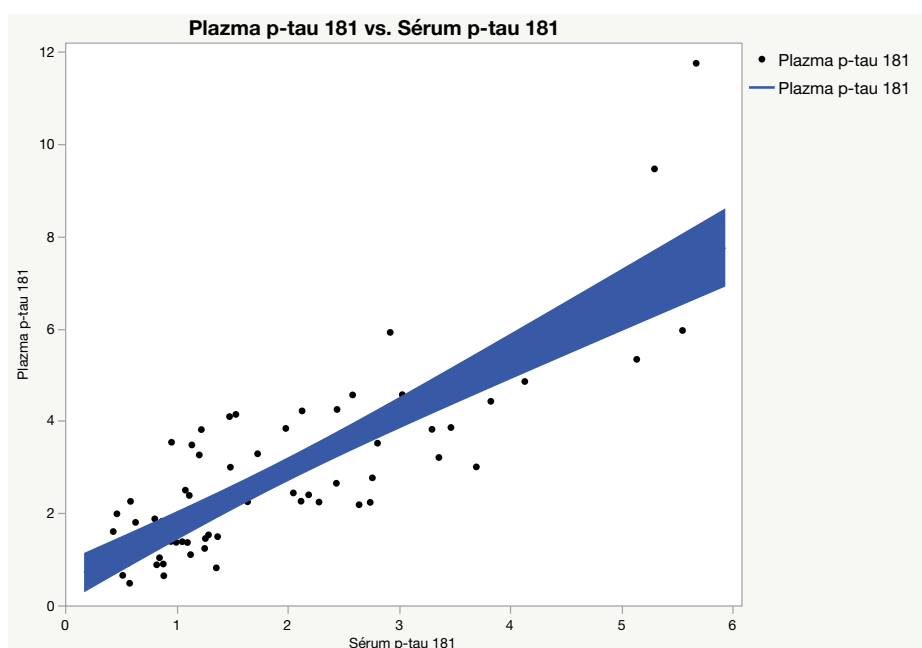


**Graf 9 Korelace koncentrace p-tau 181 v CSF a séru (všechny hodnoty).** Koncentrace p-tau 181 jsou udávány v pg/ml.  $P < 0,0001$ ,  $r_s = 0,6308$ .



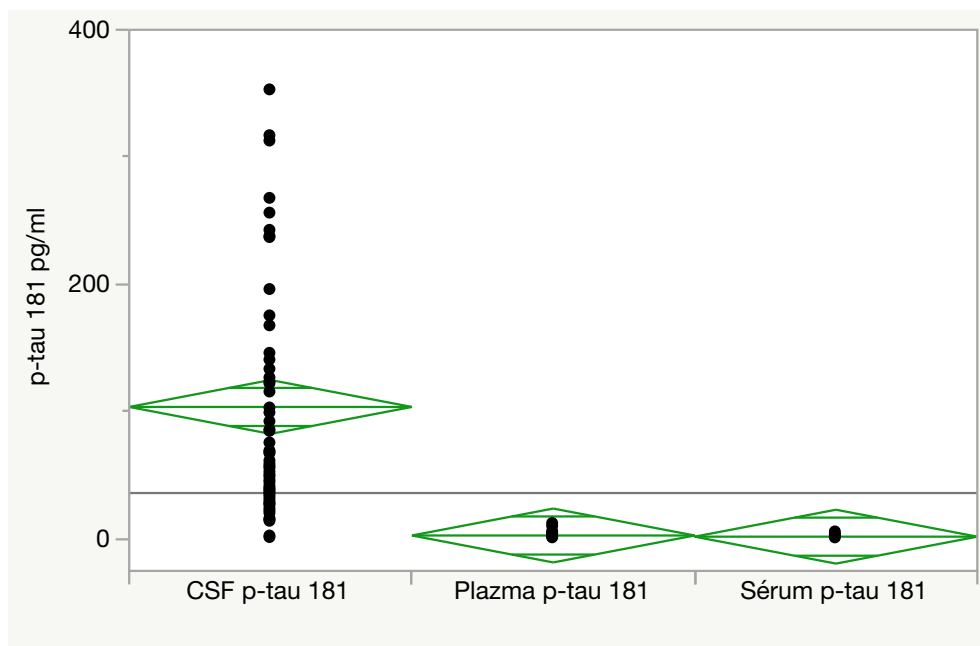
**Graf 10 Korelace koncentrace p-tau 181 v CSF a séru (menší rozsah hodnot).** Koncentrace p-tau 181 jsou udávány v pg/ml.  $P < 0,0001$ ,  $r_s = 0,6308$ .

Při sledování koncentrace p-tau 181 v plazmě a séru vyšla hodnota  $P < 0,0001$ , tedy zamítáme nulovou hypotézu, že mezi koncentracemi p-tau 181 v plazmě a séru není vztah. Spearmanův korelační koeficient ( $r_s$ ) vyšel 0,7889, tedy mezi hodnotami p-tau 181 v plazmě a séru sledujeme silnou korelaci (Graf 11).



**Graf 11 Korelace koncentrace p-tau 181 v plazmě a séru (všechny hodnoty).** Koncentrace p-tau 181 jsou udávány v pg/ml.  $P < 0,0001$ ,  $r_s = 0,7889$ .

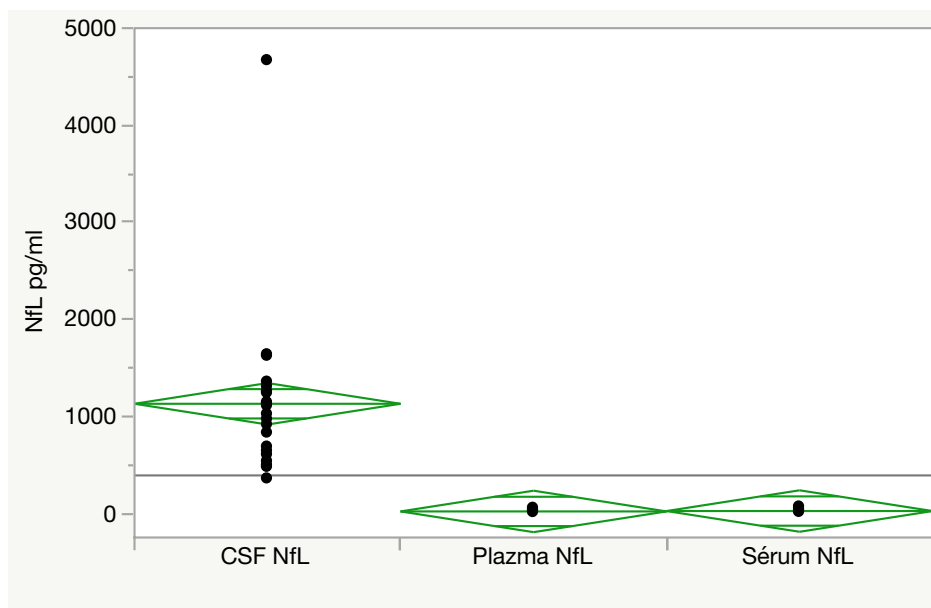
Pro vytvoření přehledu o získaných údajích přikládáme následující grafy (Graf 11, 12 a 13), ve kterých lze sledovat celkové rozložení našich dat koncentrací p-tau 181, které koreluje s hodnotami uvedenými výrobcem (Quanterix). V našich, ale také v datech od výrobce, sledujeme nejnižší hodnoty p-tau 181 v séru, za kterými těsně následují hodnoty v plazmě. Koncentrace p-tau 181 jsou nejvyšší v CSF (Graf 12).



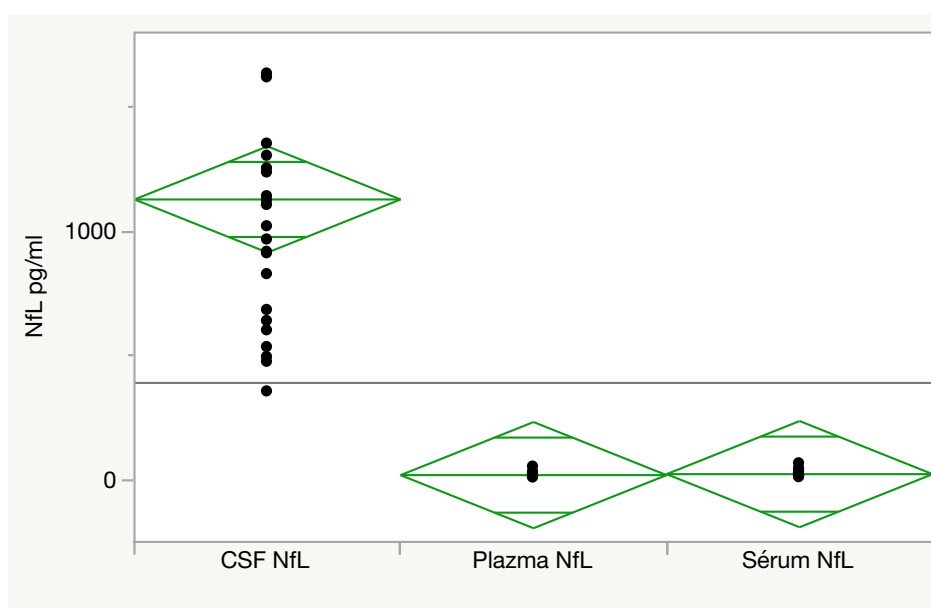
*Graf 12 Přehled celkového rozdělení dat p-tau 181 v CSF, plazmě a séru. Koncentrace p-tau 181 jsou udávány v pg/ml.*

Celkové rozložení našich dat koncentrací NfL je uvedeno v grafech 13 a 14. I toto rozložení koreluje s hodnotami uvedenými výrobcem (Quanterix). V našich, ale také v datech od výrobce, sledujeme nejnižší hodnoty NfL v plazmě, za kterými velmi těsně následují hodnoty v séru. Koncentrace NfL jsou také nejvyšší v CSF.





*Graf 13 Přehled celkového rozdělení dat NfL v CSF, plazmě a séru (všechny hodnoty).  
Koncentrace NfL jsou udávány v pg/ml.*



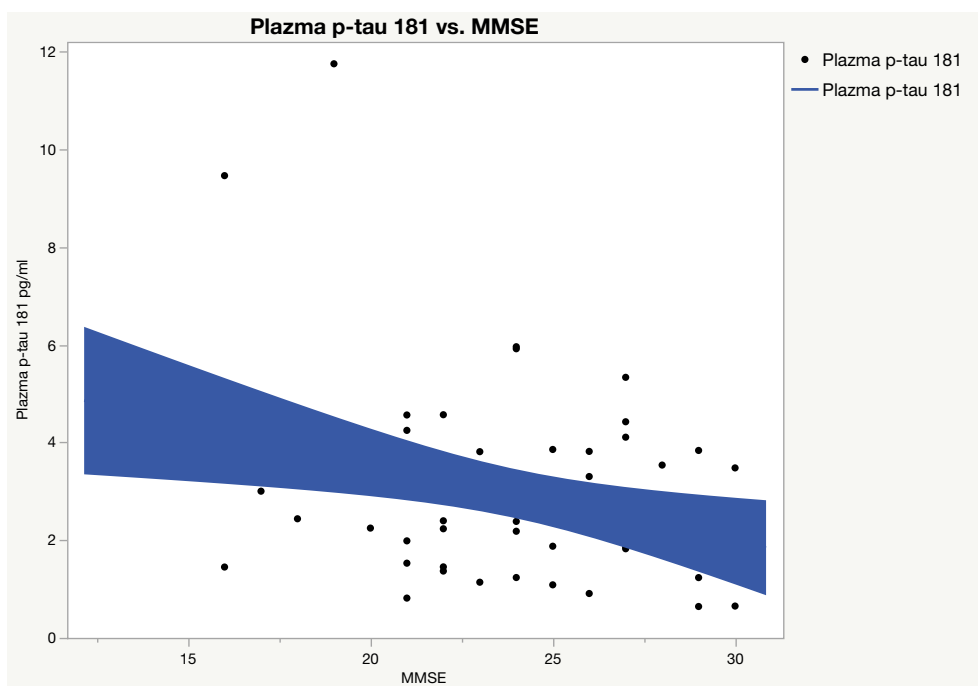
*Graf 14 Přehled celkového rozdělení dat NfL v CSF, plazmě a séru (menší rozsah hodnot).  
Koncentrace NfL jsou udávány v pg/ml.*

### **Korelace plazmového p-tau 181 a MMSE**

K ověření možné korelace mezi hodnotami plazmového p-tau 181 a výsledky v MMSE testu byl použit Spearmanův korelační koeficient. Naše hladina významnosti alpha byla nastavena na hodnotu  $\alpha = 0,05$ . Na sledování síly korelace byl používán koeficient rs.

Pozitivní nebo negativní hodnoty od 0,00 do 0,19 představovali velmi slabou korelaci, hodnoty od 0,20 do 0,39 slabou korelaci, hodnoty od 0,40 do 0,69 mírnou korelaci, hodnoty od 0,70 do 0,89 silnou korelaci, a nakonec hodnoty od 0,90 do 1,00 velmi silnou korelaci.

Při sledování korelace plazmového p-tau 181 se skóry MMSE vyšla hodnota  $P=0,0387$ , zamítáme tedy nulovou hypotézu, že mezi plazmovým p-tau 181 a úrovní kognice měřenou testem MMSE neexistuje vztah. Spearmanův korelační koeficient ( $r_s$ ) vyšel  $-0,2747$ , což představuje slabou negativní korelaci (Graf 15).



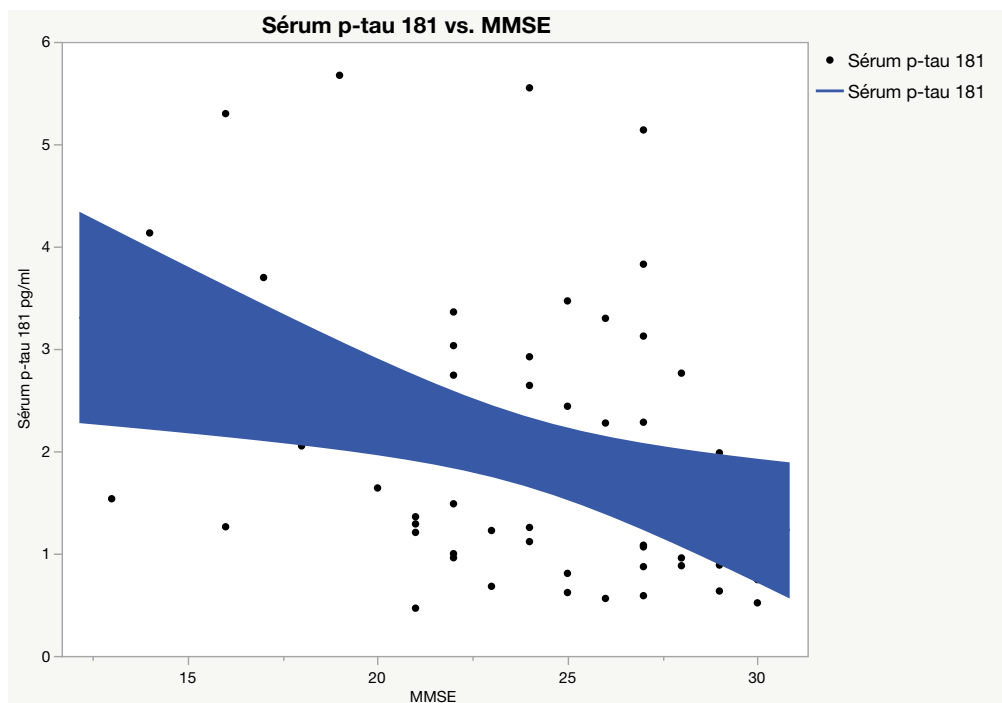
*Graf 15 Korelace plazmového p-tau 181 s kognitivní úrovní měřenou testem MMSE. Koncentrace p-tau 181 jsou udávány v pg/ml, MMSE je hodnoceno bodově, přičemž maximální počet získaných bodů je 30.  $P=0,0387$ ,  $r_s=-0,2747$ .*

### **Korelace sérového p-tau 181 a MMSE**

K ověření možné korelace mezi hodnotami sérového p-tau 181 a výsledky v MMSE testu byl použit Spearmanův korelační koeficient. Naše hladina významnosti alpha byla nastavena na hodnotu  $\alpha=0,05$ . Na sledování síly korelace byl používán koeficient  $r_s$ . Pozitivní nebo negativní hodnoty od 0,00 do 0,19 představovali velmi slabou korelaci, hodnoty od 0,20 do 0,39 slabou korelaci, hodnoty od 0,40 do 0,69 mírnou korelaci, hodnoty od 0,70 do 0,89 silnou korelaci, a nakonec hodnoty od 0,90 do 1,00 velmi silnou korelaci.

Při sledování korelace sérového p-tau 181 se skóry v testu MMSE vyšla hodnota  $P=0,0019$  zamítáme tedy nulovou hypotézu, že mezi sérovým p-tau 181 a úrovní kognice

měřenou testem MMSE neexistuje vztah. Spearmanův korelační koeficient ( $r_s$ ) vyšel 0,4027, což představuje mírnou negativní korelaci. Tedy čím nižší jsou hodnoty výsledků testu MMSE, tím vyšší jsou hodnoty koncentrace sérového p-tau 181 (Graf 16).

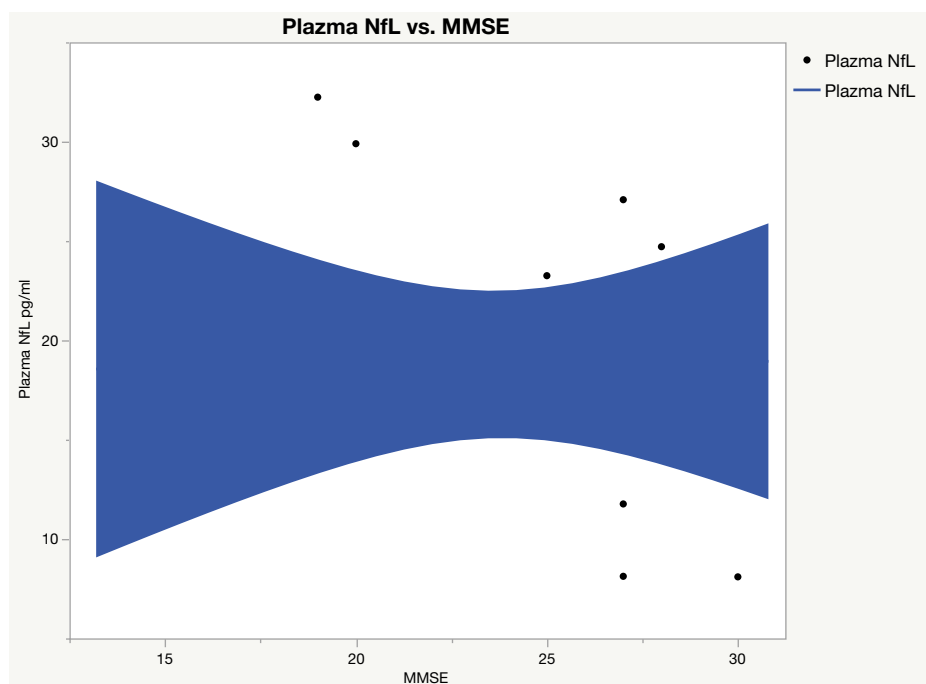


*Graf 16 Korelace sérového p-tau 181 s kognitivní úrovní měřenou testem MMSE. Koncentrace p-tau 181 jsou udávány v pg/ml, MMSE je hodnoceno bodově, přičemž maximální počet získaných bodů je 30.  $P= 0,0019$ ,  $r_s= 0,4027$ .*

### **Korelace plazmového NfL a MMSE**

K ověření možné korelace mezi hodnotami plazmového NfL a výsledky v MMSE testu byl použit Spearmanův korelační koeficient. Naše hladina významnosti alpha byla nastavena na hodnotu  $\alpha= 0,05$ . Na sledování síly korelace byl použit koeficient  $r_s$ . Pozitivní nebo negativní hodnoty od 0,00 do 0,19 představovali velmi slabou korelaci, hodnoty od 0,20 do 0,39 slabou korelaci, hodnoty od 0,40 do 0,69 mírnou korelaci, hodnoty od 0,70 do 0,89 silnou korelaci, a nakonec hodnoty od 0,90 do 1,00 velmi silnou korelaci.

Při sledování korelace plazmového NfL s výsledky pacientů v testu MMSE vyšla hodnota  $P= 0,9609$  což znamená, že přijímáme nulovou hypotézu, že mezi plazmovým NfL a kognitivním deficitem dokázaným testem MMSE neexistuje žádný vztah. Spearmanův korelační koeficient ( $r_s$ ) vyšel -0,0124, což představuje velmi slabou negativní korelaci (Graf 17).

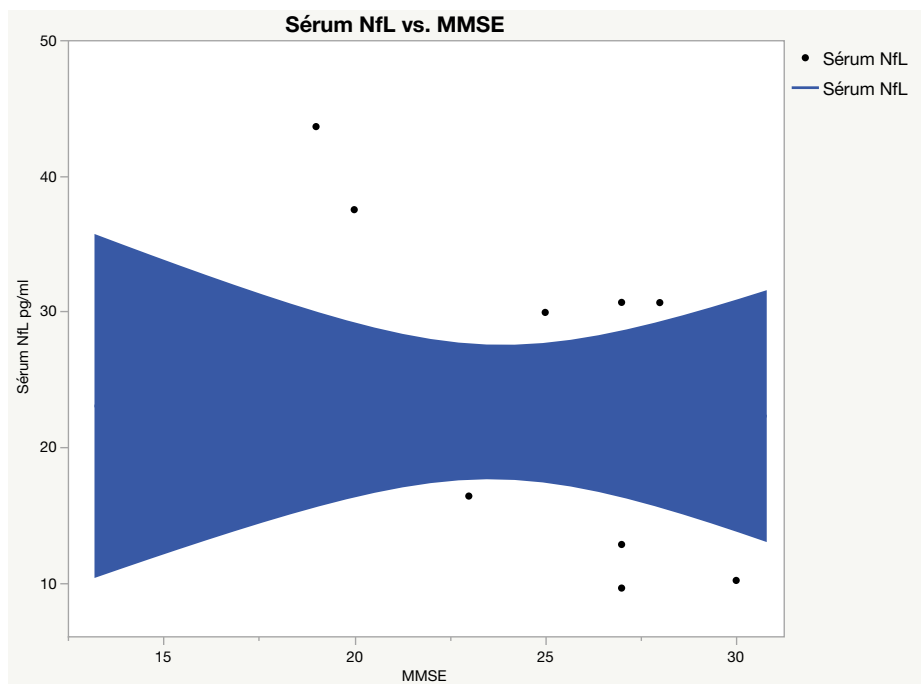


*Graf 17 Korelace plazmového NfL s kognitivní úrovní měřenou testem MMSE. Koncentrace NfL jsou udávány v pg/ml, MMSE je hodnoceno bodově, přičemž maximální počet získaných bodů je 30.  $P= 0,9609$ ,  $r_s= -0,0124$ .*

### **Korelace sérového NfL a MMSE**

K ověření možné korelace mezi hodnotami sérového NfL a výsledky v MMSE testu byl použit Spearmanův korelační koeficient. Naše hladina významnosti alpha byla nastavena na hodnotu  $\alpha= 0,05$ . Na sledování síly korelace byl používán koeficient  $r_s$ . Pozitivní nebo negativní hodnoty od 0,00 do 0,19 představovali velmi slabou korelaci, hodnoty od 0,20 do 0,39 slabou korelaci, hodnoty od 0,40 do 0,69 mírnou korelaci, hodnoty od 0,70 do 0,89 silnou korelaci, a nakonec hodnoty od 0,90 do 1,00 velmi silnou korelaci.

Při sledování korelace sérového NfL se skóry v testu MMSE vyšla hodnota  $P= 0,9252$ , přijímáme tedy nulovou hypotézu, že mezi sérovým NfL a úrovní kognice měřenou testem MMSE neexistuje žádný vztah. Spearmanův korelační koeficient ( $r_s$ ) vyšel  $-0,0238$ , což představuje velmi slabou negativní korelaci (Graf 18).



*Graf 18 Korelace sérového NfL s kognitivním deficitem zachyceným testem MMSE. Koncentrace NfL jsou udávány v pg/ml, MMSE je hodnoceno bodově, přičemž maximální počet získaných bodů je 30.  $P= 0,9252$ ,  $r_s= -0,0238$ .*

## 6 DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo stanovit biomarkery v krvi pomocí ultrasenzitivní Simoa TM (Single molecular assay) technologie a ověřit jejich vztah k hodnotám v CSF. Do diplomové práce bylo vybráno celkem 75 jedinců z Czech Brain Agein Study, včetně kognitivně zdravých kontrol (n=14), jedinců ve stadiu MCI (n=34) a jedinců ve stadiu syndromu demence (n=27). Všichni tyto jedinci měli k dispozici vzorky CSF, plazmy a séra. Koncentrace NfL v CSF, plazmě a séru byly změřeny u 22 jedinců a koncentrace a p-tau 181 v CSF, plazmě a séru byly změřeny 72 jedincům. Do diplomové práce byly zařazeni pacienti s různou etiologií - AN, FTLN, LBD, protože cílem práce bylo sledování možného vztahu mezi hodnotami plazmových a sérových biomarkerů s markery v CSF. Koncentrace biomarkerů v CSF byly měřeny metodou ELISA. Analyzovány byly pomocí EUROIMMUN (EI) ELISA (EUROIMMUN AG, Lübeck, Německo). Vzorky plazmy a séra byly analyzovány pomocí analyzátoru Quanterix SR-X s použitím Simoa technologie.

Při statistické analýze s použitím Spearmanova korelačního koeficientu jsme zjistili, že mezi hodnotami koncentrace NfL v CSF a plazmě žádný vztah neexistuje ( $r = 0,2908$ ,  $P = 0,1892$ ). Žádný vztah jsme nesledovali ani mezi hodnotami koncentrace NfL v CSF a séru ( $r = 0,3631$ ,  $P = 0,0969$ ). Vzájemně ale koncentrace plazmového a sérového NfL mezi sebou koreluje ( $r = 0,9695$ ,  $P < 0,0001$ ). Naše výsledky tedy nenavazují na jiné studie, které dokázaly, že CSF a plazmové NfL úzce koreluje (Gisslén et al., 2016; Hansson et al., 2017). Existuje i několik studií, které prokázaly těsnou pozitivní souvislost mezi hladinami CSF a sérovým NfL (Kuhle et al., 2016; Bacioglu et al., 2016; Brodovitch et al., 2021; Benatar et al., 2020). My jsme ale korelaci mezi sérovým NfL a CSF NfL nenašli. Celkové rozložení koncentrací dat NfL v CSF, plazmě a séru ale korelovalo s hodnotami uvedenými výrobcem (Quanterix). V našich, ale také v datech od výrobce, sledujeme nejnižší hodnoty NfL v plazmě, za kterými velmi těsně následují hodnoty v séru. Koncentrace NfL jsou také nejvyšší v CSF. Z toho usuzujeme, že během měření nedošlo k pochybení a výsledky jsou tedy spolehlivé. Neexistující vztah mezi hodnotami NfL v séru, plazmě a CSF tedy mohl být způsoben malým souborem jedinců vybraných do diplomové práce, kterým byly NfL měřeny.

Výsledky statistické analýzy vztahu CSF p-tau 181 a plazmovým a sérovým p-tau 181 jsou v souladu s naší výzkumnou hypotézou. Mezi hodnotami koncentrace p-tau 181 v CSF a plazmě existuje pozitivní korelace ( $r = 0,4737$ ,  $P < 0,0001$ ). Tyto výsledky jsou ve shodě s předchozími pozorováními, kdy bylo prokázáno, že plazmatické koncentrace

p-tau 181 jsou spojeny se současně schválenými měřeními biomarkerů, mezi něž patří i CSF p-tau 181 (Thijssen et al., 2020; Karikari et al., 2020; Karikari et al., 2021; Janelidze et al., 2020). Výsledky statistické analýzy vztahu CSF p-tau 181 a sérovým p-tau 181 prokázali silnější korelaci ( $r = 0,6308$ ,  $P < 0,0001$ ). Celkové rozložení dat koncentrací p-tau 181 v CSF, plazmě a séru taky koreluje s hodnotami uvedenými výrobcem (Quanterix). V našich, ale také v datech od výrobce, sledujeme nejnižší hodnoty p-tau 181 v séru, za kterými těsně následují hodnoty v plazmě. Koncentrace p-tau 181 jsou nejvyšší v CSF.

Dalším cílem diplomové práce bylo vysledovat vztah mezi krevními biomarkery a úrovní kognice AN. Změřené plazmové a sérové koncentrace p-tau 181 byly porovnávány s výsledky testu MMSE daných jedinců. K ověření možného vztahu mezi hodnotami plazmového p-tau 181 a výsledky v MMSE testu daných pacientů byl použit Spearmanův korelační koeficient. Při statistické analýze jsme zjistili, že mezi hodnotami koncentrace plazmového p-tau 181 a hodnotami v testu MMSE existuje vztah ( $r = -0,2747$ ,  $P = 0,0387$ ). Silnější korelaci jsme pozorovali mezi sérovým p-tau 181 a kognitivní úrovní měřenou testem MMSE ( $r = -0,4027$ ,  $P = 0,0019$ ). Z toho vyplývá, že čím nižší jsou hodnoty výsledků testu MMSE (tedy čím více jsou poškozeny kognitivní funkce), tím vyšší jsou hodnoty koncentrace sérového p-tau 181. Naše výsledky tedy navazují na jiné studie, které prokázaly, že sérový p-tau 181 úzce koreluje s hodnotami MMSE (Qin et al., 2022). Nepozorovali jsme žádnou souvislost mezi plazmovým a sérovým NfL a výsledky testu MMSE. Tyhle výsledky jsou v protikladu s již publikovanými výsledky jiných studií, které vztah mezi danými proměnnými dokázali (Huang et al., 2022; Mielke et al., 2019; Mattsson et al., 2019). Tento rozpor však může také částečně souviset s omezenou velikostí naší kohorty.

Z našich výsledků tedy vyplývá, že plazmový a sérový p-tau181 analyzovaný Simoa technologií koreluje s CSF p-tau181, který byl analyzován pomocí metody ELISA. Na druhé straně jsme nenašli žádný vztah mezi CSF, plazmovým a sérovým NfL. Také kognitivní úroveň měřená testem MMSE koreluje s koncentracemi p-tau 181 v plazmě a séru. Při NfL jsme tenhle vztah ale nesledovali. Naše rozporné výsledky korelací NfL byly zřejmě způsobené malou kohortou měřených pacientů. Prokázány byly ale korelace plazmových a sérových hodnot obou měřených biomarkerů.

Korelace biomarkerů v CSF a krvi ale nevyšli tak, jak jsme očekávali. Na základě těchto výsledků nemůžeme v současné době považovat plazmový ani sérový p-tau 181 za spolehlivý biomarker. Hlavní limitací této diplomové práce byl právě malý soubor jedinců. Do práce byli vybíráni jedinci s dostupnými vzorky CSF, plazmy a séra. V rámci CBAS je kvůli dlouhodobé kolekci k dispozici velké množství vzorků CSF a séra.

Náběr vzorků plazmy zpomalila aktuální pandemická situace. I přes zlepšení situace chodí na náběry stále málo pacientů. Studie zabývající se krevními biomarkery neurodegenerativních onemocnění využívají k jejich měření většinou vzorek plazmy. Proto jsme se v rámci diplomového projektu rozhodli pohlédnout i na korelace plazmových a sérových hodnot biomarkerů. Na naší malé kohortě pacientů jsme prokázali pozitivní korelaci mezi sérovými a plazmovými hodnotami p-tau 181 a NfL. Ve studii plánuji pokračovat i nadále, ať už v rámci projektu Nové biofluidní biomarkery a jejich role v diagnostice a prognóze neurodegenerativních demencí, kterého jsem hlavní řešitelkou, a který byl podpořen Grantovou agenturou Univerzity Karlovy, nebo i v rámci následujícího doktorského studia Neurověd na 2. lékařské fakultě Karlovy Univerzity. Můj diplomový projekt považuji za pilotní, protože ve zmíněných projektech budu biomarkery analyzovat na větším souboru jedinců.



## 7 ZÁVĚR

Výsledky diplomové práce prokázaly existující vztah mezi CSF a plazmovými a sérovými hodnotami p-tau 181, ale ne zcela dle našeho očekávání. Tato zjištění tedy ještě nenaznačují, že p-tau 181 by se mohl využívat jako krevní biomarker neurodegenerativních onemocnění, a tímto způsobem být snadno implementovatelný do klinických studií a prostředí primární péče. Naše výsledky prokázaly i korelaci mezi plazmovým a sérovým p-tau 181 a kognitivní úrovní prokázanou v testu MMSE. K potvrzení korelace je třeba ještě více studií. Tímto způsobem by ale zvýšený plazmový nebo sérový p-tau 181 mohl dopomoci k identifikaci pacienta do dané diagnostické kategorie- MCI nebo demence. Sledovaný neexistující vztah mezi koncentracemi NfL v CSF, plazmě a séru mohl být způsoben nízkým počtem vybraných účastníků.

Standardní vyšetření neurodegenerativních onemocnění, jako jsou vyšetření CSF a PET, nelze provádět v rámci obecné praxe. Vzhledem k vysoké prevalenci těchto onemocnění by alternativy, jako jsou biomarkery založené na krvi, představovaly významný pokrok. Proto se domníváme, že potvrzení korelace sérového a plazmového p-tau 181 s CSF p-tau 181 může být klinicky významné.

Diplomový projekt byl zasazen do již dlouhodobého výzkumného projektu Czech Brain Aging Study (CBAS) pod záštitou Kognitivního centra při Neurologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole. V rámci CBAS máme k dispozici retrospektivně velké množství vzorků séra, které se účastníkům studie odebírá již dlouhodobě. Nové studie zabývající se krevními markery neurodegenerativních onemocnění pracují pouze s plazmou, a proto byla pro nás v rámci diplomové práce klíčová otázka, zda mají sérum a plazma podobné hodnoty naměřených biomarkerů, zda se sebou tyto hodnoty korelují, a tedy zda je lze ve studiích používat i vzorky séra. Jelikož jsme v diplomové práci prokázali korelaci koncentrací biomarkerů v séru a plazmě, víme v případě potvrzení spolehlivosti nějakého biomarkeru AN zpětně změřit velký počet vzorků séra a vyvodit z toho určité závěry. Odběr a skladování séra a plazmy je stejné, tedy dlouhodobé využívání plazmy ve studiích krevních biomarkerů je zřejmě jen zažitou praktikou. V rámci CBAS je plazma sbírána prospektivně asi dva roky. Jelikož byla právě pro pacienty Neurologické kliniky aktuální pandemická situace velmi ohrožující, náběr vzorků byl velmi zpomalen, a proto byl do diplomové práce vybrán menší počet účastníků.

Myslíme si, že výzkum v oblasti neurodegenerativních onemocnění by se měl i nadále ubírat směrem k biofluidním biomarkerům. Přesná diagnóza základní patologie je klíčovým krokem při vývoji strategie léčby zmíněných onemocnění. Přestože odběr vzorků CSF lumbální punkcí je invazivní ambulantní zákrok, CSF stále představuje slibný zdroj biomarkerů pro poruchy centrálního nervového systému. Vzhledem k přímému kontaktu s mozkovým parenchymem CSF potenciálně odráží cerebrální patofyziologické procesy vyskytující se během daného onemocnění. Přestože CSF a neurozobrazovací biomarkery nabízejí vynikající diagnostickou přesnost a mohou být klíčovými faktory při diferenciálních diagnostických postupech, jakož i při pochopení komorbidní neuropatologie, biomarkery založené na krvi nabízejí oproti CSF a neurozobrazovacím biomarkerům důležité výhody tím, že jsou méně invazivní, přijatelnější pro pacienty a nákladově a časově efektivní. Krevní biomarkery proto nabízejí ideální doplňkový krok k pokročilým CSF a neurozobrazovacím biomarkerům.

## 8 LITERATURA

Aarsland, D., Ballard, C., G., Halliday, G. (2004) Are Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies the same entity? *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 17:137-145

Alafuzoff, I., Ince, P., G., Arzberger, T., Al-Sarraj, S., Bell, J., Bodi, I., Bogdanovic, N., Bugiani, O., Ferrer, I., Gelpi, E., Gentleman, S., Giaccone, G., Ironside, J., W., Kavantzias, N., King, A., Korkolopoulou, P., Kovács, G., G., Meyronet, D., Monoranu, C., Parchi, P., Parkkinen, L., Patsouris, E., Roggendorf, W., Rozemuller, A., Stadelmann-Nessler, C., Streichenberger, N., Thal, D., R., and Kretschmar, H. (2009) Staging/typing of Lewy body related alpha-synuclein pathology: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Acta Neuropathol.* 117: 635-652

Alafuzoff, I., Pikkarainen, M., Neumann, M., Arzberger, T., Al-Sarraj, S., Bodi, I., Bogdanovic, N., Bugiani, O., Ferrer, I., Gelpi, E., Gentleman, S., Giaccone, G., Graeber, M., B., Hortobagyi, T., Ince, P., G., Ironside, J., W., Kavantzias, N., King, A., Korkolopoulou, P., Kovács, G., G., Meyronet, D., Monoranu, C., Nilsson, T., Parchi, P., Patsouris, E., Revesz, T., Roggendorf, W., Rozemuller, A., Seilhean, D., Streichenberger, N., Thal, D., R., Wharton, S., B., and Kretschmar, H. (2015) Neuropathological assessments of the pathology in frontotemporal lobar degeneration with TDP43-positive inclusions: an inter-laboratory study by the BrainNet Europe consortium. *J Neural Transm (Vienna).* 122: 957-72

Albert, M., S., DeKosky, S., T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H., H., Fox, N., C., Gamst, A., Holtzman, D., M., Jagust, W., J., Petersen, R., C. (2011) The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7: 270-279

Alzheimer's Association (2016) What is preclinical Alzheimer's disease? Dostupní: <https://www.alzheimersblog.org/2016/10/27/preclinical-alzheimers-disease/>

Antonell, A., Tort-Merino, A., Ríos, J., Balasa, M., Borrego-Écija, S., Auge, J., M., Muñoz-García, C., Bosch, B., Falgàs, N., Rami, L., Ramos-Campoy, O., Blennow, K., Zetterberg, H., Molinuevo, J., L., Lladó, A., Sánchez-Valle, R. (2020) Synaptic, axonal damage and inflammatory cerebrospinal fluid biomarkers in neurodegenerative dementias. *Alzheimers Dement.* 16: 262-272

Bacioglu, M., Maia, L., F., Preische, O., Schelle, J., Apel, A., Kaeser, S., A., Schweighauser, M., Eninger, T., Lambert, M., Pilotto, A., Shimshek, D., R., Neumann, U., Kahle, P., J., Staufenbiel, M., Neumann, M., Maetzler, W., Kuhle, J., Jucker, M. (2016) Neurofilament Light Chain in Blood and CSF as Marker of Disease Progression in Mouse Models and in Neurodegenerative Diseases. *Neuron*. 91: 56-66

Bartoš, A., Čechová, L., Švarcová, J., Říčný, J., Řípková, D. (2012) Likvorový triplet (tau proteiny a beta-amyloid) v diagnostice Alzheimerovy-Fischerovy nemoci. *Cesk Slov Neurol N*. 75/108: 587-594

Bates, K., A., Verdile, G., Li, Q., Ames, D., Hudson, P., Masters, C. (2009) Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-beta peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry*. 14: 469-486

Bateman, R., J., Aisen, P., S., De Strooper, B., Fox, N., C., Lemere, C., A., Ringman, J., M., Salloway, S., Sperling, R., A., Windisch, M., Xiong, C. (2011) Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 3: 1

Bateman, R., J., Xiong, C., Benzinger, T., L., Fagan, A., M., Goate, A., Fox, N., C., Marcus, D., S., Cairns, N., J., Xie, X., Blazey, T., M., Holtzman, D., M., Santacruz, A., Buckles, V., Oliver, A., Moulder, K., Aisen, P., S., Ghetti, B., Klunk, W., E., McDade, E., Martins, R., N., Masters, C., L., Mayeux, R., Ringman, J., M., Rossor, M., N., Schofield, P., R., Sperling, R., A., Salloway, S., Morris, J., C.; Dominantly Inherited Alzheimer Network. (2012) Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 367: 795-804

Benatar, M., Zhang, L., Wang, L., Granit, V., Statland, J., Barohn, R., Swenson, A., Ravits, J., Jackson, C., Burns, T., M., Trivedi, J., Piro, E., P., Caress, J., Katz, J., McCauley, J., L., Rademakers, R., Malaspina, A., Ostrow, L., W., Wu, J., CReATe, Consortium. (2020) Validation of serum neurofilaments as prognostic and potential pharmacodynamic biomarkers for ALS. *Neurology*. 95: e59-e69

Besson, F., L., La Joie, R., Doeuvre, L., Gaubert, M., Mézenge, F., Egret, S., Landeau, B., Barré, L., Abbas, A., Ibazizene, M., de La Sayette, V., Desgranges, B., Eustache, F., Chételat, G. (2015) Cognitive and Brain Profiles Associated with Current Neuroimaging Biomarkers of Preclinical Alzheimer's Disease. *J Neurosci*. 35: 10402-10411

Blennow, K., Dubois, B., Fagan, A., M., Lewczuk, P., de Leon, M., J., Hampel, H. (2015) Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 11: 58-69

- Blennow, K., Hampel, H. (2003) CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2: 605-613
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., Zetterberg H. (2010) Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 6: 131-144
- Braak, H., Braak, E. (1998a) Argyrophilic grain disease: frequency of occurrence in different age categories and neuropathological diagnostic criteria. *J Neural Transm.* 105: 801-19
- Braak, H., Braak, E. (1998b) Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl.* 53: 127-140
- Brettschneider, J., Del, Tredici, K., Lee, V., M., Trojanowski, J., Q. (2015) Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci.* 16: 109–120
- Brodovitch, A., Boucraut, J., Delmont, E., Parlanti, A., Grapperon, A., M., Attarian, S., Verschueren, A. (2021) Combination of serum and CSF neurofilament-light and neuroinflammatory biomarkers to evaluate ALS. *Sci Rep.* 11: 703
- Brunden, K., R., Zhang, B., Carroll, J., Yao, Y., Potuzak, J., S., Hogan, A., M., Iba, M., James, M., J., Xie, S., X., Ballatore, C., Smith, A., B., 3rd, Lee, V., M., Trojanowski, J., Q. (2010) Epopilone D improves microtubule density, axonal integrity, and cognition in a transgenic mouse model of tauopathy. *J Neurosci.* 30: 13861-13866
- Buerger, K., Ewers, M., Pirttilä, T., Zinkowski, R., Alafuzoff, I., Teipel, S., J., DeBernardis, J., Kerkman, D., McCulloch, C., Soininen, H., Hampel, H. (2006) CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *129: 3035-3041*
- Buée, L., Bussièrè, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P., R. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 33: 95-130
- Cairns, N., J., Bigio, E., H., Mackenzie, I., R., Neumann, M., Lee, V., M., Hatanpaa, K., J., White, C., L., 3rd, Schneider, J., A., Grinberg, L., T., Halliday, G., Duyckaerts, C., Lowe, J., S., Holm, I., E., Tolnay, M., Okamoto, K., Yokoo, H., Murayama, S., Woulfe, J., Munoz, D., G., Dickson, D., W., Ince, P., G., Trojanowski, J., Q., Mann, D., M. (2007) Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol.* 114: 5-22

- Carrell, R., W., and Lomas, D., A. (1997) Conformational disease. *Lancet*. 350: 134-138
- Cleveland, D., W., Hoffman, P., N. (1991) Neuronal and glial cytoskeletons. *Curr Opin Neurobiol*. 1: 346-353
- Cohen, L., Walt, D., R. (2019) Highly Sensitive and Multiplexed Protein Measurements. *Chem. Rev*. 119: 293–321
- Coumans, F., A., W., Gool, E., L., Nieuwland, R. (2017) Bulk immunoassays for analysis of extracellular vesicles. *Platelets*. 28: 242–248
- Crous-Bou, M., Minguillón, C., Gramunt, N., Molinuevo, J., L. (2017) Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimers Res Ther*. 9: 71
- Čechová, K., Mazancova, A., F., Marková, H., Cerman, J., Lerch, O., Sheardová, K., Šumec, R., Maková, T., Andresová, J., Příhodová, A., Babej, S., Dostálová, L., Růžička, V., Vaňková, H. (2019) Mozek a jeho změny u syndromu měrné kognitivní poruchy. In: *V bludišti jménem Alzheimer*, Čechová, K., Mazancova, A., F., Marková, H. (ed), Albatros media a.s., Praha, Česká republika, pp. 165-182
- Dickerson, B., C., Feczko, E., Augustinack, J., C., Pacheco, J., Morris, J., C., Fischl, B., Buckner, R., L. (2009) Differential effects of aging and Alzheimer's disease on medial temporal lobe cortical thickness and surface area. *Neurobiol Aging*. 30: 432-440
- Draper, B., Cations, M., White, F., Trollor, J., Loy, C., Brodaty, H., Sachdev, P., Gonski, P., Demirkol, A., Cumming, R., G., Withall, A. (2016) Time to diagnosis in young-onset dementia and its determinants: the INSPIRED study. *Int J Geriatr Psychiatry*. 31: 1217-1224
- Drew, L. (2018) An age-old story of dementia. *Nature*. Dostupní: <https://www.nature.com/articles/d41586-018-05718-5>
- Drucker, E., Krapfenbauer, K. (2013) Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive and personalised medicine. *EPMA Journal* 4, 7
- Du, A., T., Schuff, N., Kramer, J., H., Ganzer, S., Zhu, X., P., Jagust, W., J., Miller, B., L., Reed, B., R., Mungas, D., Yaffe, K., Chui, H., C., Weiner, M., W. (2004) Higher atrophy rate of entorhinal cortex than hippocampus in AD. *Neurology*. 62: 422-427
- Dubois, B., Feldman, H., H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J., L., Blennow, K., DeKosky, S., T., Gauthier, S., Selkoe, D., Bateman, R., Cappa, S., Crutch, S., Engelborghs, S., Frisoni, G., B., Fox, N., C., Galasko, D., Habert, M., O., Jicha, G., A., Nordberg, A., Pasquier, F., Rabinovici, G., Robert, P., Rowe, C., Salloway, S., Sarazin, M.,

Epelbaum, S., de Souza, L., C., Vellas, B., Visser, P., J., Schneider, L., Stern, Y., Scheltens, P., Cummings, J., L. (2014) Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* 13: 614-629

Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H., H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., Broich, K., Cavado, E., Crutch, S., Dartigues, J., F., Duyckaerts, C., Epelbaum, S., Frisoni, G., B., Gauthier, S., Genthon, R., Gouw, A., A., Habert, M., O., Holtzman, D., M., Kivipelto, M., Lista, S., Molinuevo, J., L., O'Bryant, S., E., Rabinovici, G., D., Rowe, C., Salloway, S., Schneider, L., S., Sperling, R., Teichmann, M., Carrillo, M., C., Cummings, J., Jack, C., R., Jr.; Proceedings of the Meeting of the International Working Group (IWG) and the American Alzheimer's Association on "The Preclinical State of AD"; July 23, 2015; Washington DC, USA. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement.* 12: 292-323

Dugger, B., N., Dickson, D., W. (2017) Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9: a028035

Engelborghs, S., Niemantsverdriet, E., Struyfs, H., Blennow, K., Brouns, R., Comabella, M., Dujmovic, I., van der Flier, W., Frölich, L., Galimberti, D., Gnanapavan, S., Hemmer, B., Hoff, E., Hort, J., Jacobaeus, E., Ingelsson, M., Jan de Jong, F., Jonsson, M., Khalil, M., Kuhle, J., Lleó, A., de Mendonça, A., Molinuevo, J., L., Nagels, G., Paquet, C., Parnetti, L., Roks, G., Rosa-Neto, P., Scheltens, P., Skårsgard, C., Stomrud, E., Tumani, H., Visser, P., J., Wallin, A., Winblad, B., Zetterberg, H., Duits, F., Teunissen, C., E. (2017) Consensus guidelines for lumbar puncture in patients with neurological diseases. *Alzheimers Dement (Amst).* 8: 111-126

Eratne, D., Loi, S., M., Farrand, S., Kelso, W., Velakoulis, D., Looi, J., C. (2018) Alzheimer's disease: clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. *Australas Psychiatry.* 26: 347-357

European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (2018) Guideline on the clinical investigation of medicines for the treatment of Alzheimer's disease. Dostupní:

[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2018/02/WC500244609.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2018/02/WC500244609.pdf)

Fagan, A., M., Roe, C., M., Xiong, C., Mintun, M., A., Morris, J., C., Holtzman D., M. (2007) Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol,* 64: 343-349

Fath, T., Eidenmuller, J., Brandt, R. (2002) Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 22: 9733–9741

Fernandez-Martos, C., M., King, A., E., Atkinson, R., A., Woodhouse, A., Vickers, J., C. (2015) Neurofilament light gene deletion exacerbates amyloid, dystrophic neurite, and synaptic pathology in the APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 36: 2757–2767

Food and Drug Administration (2011) Guidance for industry—E16 biomarkers related to drug or biotechnology product development: context, structure, and format of qualification submissions. Dostupní: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm267449.pdf>

Food and Drug Administration (2018) Early Alzheimer's disease: developing drugs for treatment; draft guidance for industry. Dostupní: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM596728.pdf>

Gaiottino, J., Norgren, N., Dobson, R., Topping, J., Nissim, A., Malaspina, A., Bestwick, J., P., Monsch, A., U., Regeniter, A., Lindberg, R., L., Kappos, L., Leppert, D., Petzold, A., Giovannoni, G., Kuhle, J. (2013) Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases. *PLoS One.* 8: e75091

Galasko, D. (2017) Lewy Body Disorders. *Neurol Clin.* 35: 325-338

Gendron, T., F., Petrucelli, L. (2011) Rodent models of TDP-43 proteinopathy: investigating the mechanisms of TDP-43-mediated neurodegeneration. *J Mol Neurosci.* 45: 486–499

Gao, J., Wang, L., Huntley, M., L., Perry, G., Wang, X. (2018) Pathomechanisms of TDP-43 in neurodegeneration. *J Neurochem.* 10.1111

Gibson, G., E., Shi, Q. (2010) A mitocentric view of Alzheimer's disease suggests multi-faceted treatments. *J Alzheimers Dis.* 20: 591-607

Gisslén, M., Price, R., W., Andreasson, U., Norgren, N., Nilsson, S., Hagberg, L., Fuchs, D., Spudich, S., Blennow, K., Zetterberg, H. (2015) Plasma Concentration of the Neurofilament Light Protein (NFL) is a Biomarker of CNS Injury in HIV Infection: A Cross-Sectional Study. *EBioMedicine.* 3: 135-140

Goedert, M., Spillantini, M., G., Potier, M., C., Ulrich, J., Crowther, R., A. (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein



tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8: 393–389

Guo, X., Wang, Z., Li, K., Li, Z., Qi, Z., Jin, Z., Yao, L., Chen, K. (2010) Voxel-based assessment of gray and white matter volumes in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 468: 146–150

Hampel, H., Lista, S., Teipel, S., J., Garaci, F., Nisticò, R., Blennow, K., Zetterberg, H., Bertram, L., Duyckaerts, C., Bakardjian, H., Drzezga, A., Colliot, O., Epelbaum, S., Broich, K., Lehéricy, S., Brice, A., Khachaturian, Z., S., Aisen, P., S., Dubois, B. (2020) Perspective on future role of biological markers in clinical therapy trials of Alzheimer's disease: a long-range point of view beyond 2020. *Biochem Pharmacol.* 88: 426-449

Hampel, H., O'Bryant, S., E., Castrillo, J., I., Ritchie, C., Rojkova, K., Broich, K., Benda, N., Nisticò, R., Frank, R., A., Dubois, B., Escott-Price, V., Lista, S. (2016) PRECISION MEDICINE - The Golden Gate for Detection, Treatment and Prevention of Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimers Dis.* 3: 243-259

Hampel, H., O'Bryant, S., E., Molinuevo, J., L., Zetterberg, H., Masters, C., L., Lista, S., Kiddle, S., J., Batrla, R., Blennow, K. (2018) Blood-based biomarkers for Alzheimer disease: mapping the road to the clinic. *Nat Rev Neurol.* 14: 639-652.

Hampel, H., Frank, R., Broich, K., Teipel, S., J., Katz, R., G., Hardy, J., Herholz, K., Bokde, A., L., Jessen, F., Hoessler, Y., C., Sanhai, W., R., Zetterberg, H., Woodcock, J., Blennow, K. (2010) Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nat Rev Drug Discov.* 9: 560-574

Hansson, O., Janelidze, S., Hall, S., Magdalinou, N., Lees, A., J., Andreasson, U., Norgren, N., Linder, J., Forsgren, L., Constantinescu, R., Zetterberg, H., Blennow, K. (2017) Swedish BioFINDER study. Blood-based NfL: A biomarker for differential diagnosis of parkinsonian disorder. *Neurology.* 88: 930-937

Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Andreasson, U., Londos, E., Minthon, L., Blennow, K. (2007) Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Aβ<sub>42</sub>/Aβ<sub>40</sub> ratio in patients with mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 23: 316-320

Hardy, J., A., Higgins, G., A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256: 184-185

Hernández, F., Avila, J. (2007) Tauopathies. *Cell Mol Life Sci.* 64: 2219-2233  
Hesse, C., Rosengren, L., Andreasen, N., Davidsson, P., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., Blennow, K. (2001) Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neurosci Lett.* 297: 187-190

- Higashi, S., Kabuta, T., Nagai, Y., Tsuchiya, Y., Akiyama, H., Wada, K. (2013) TDP-43 associates with stalled ribosomes and contributes to cell survival during cellular stress. *J Neurochem.* 126: 288–300
- Hodson, R. (2018) Alzheimer's disease. *Nature.* Dostupní: <https://www.nature.com/articles/d41586-018-05717-6>
- Hornbeck, P. (2001) Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr Protoc Immunol.* Chapter 2: Unit 2.1.
- Huang, Y., Huang, C., Zhang, Q., Shen, T., Sun, J. (2022) Serum NFL discriminates Parkinson disease from essential tremor and reflect motor and cognition severity. *BMC Neurol.* 22: 39
- Chandra, A., Dervenoulas, G., Politis, M. (2019) Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Neurol.* 266: 1293-1302
- Ingelsson, M. (2016) Alpha-synuclein oligomers-neurotoxic molecules in Parkinson's disease and other Lewy body disorders. *Front Neurosci.* 10: 408
- Iqbal, K., Adel, C., Chen, S., Chohan, M., O., El-Akkad, E., Gong, C., X., Khatoun, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimuk, H., Grundke-Iqbal, I. (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta.* 13: 198-210
- Irwin, D., J. (2016) Tauopathies as clinicopathological entities. *Parkinsonism Relat Disord.* 22: 29-33
- Jack, C., R., Bennett, D., A., Blennow, K., Carrillo, M., C., Dunn, B., Budd, Haeberlein, S., Holtzman, D., M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J., L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K., P., Rowe, C., C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H., M., Sperling, R., Elliott, C., Masliah, E., Ryan, L., Silverberg, N. (2018) NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 14: 535-562
- Jack, Jr., C., R., Albert, M., S., Knopman, D., S., McKhann, G., M., Sperling, R., A., Carrillo, M., C., Thies, B., Phelps, C., H. (2011) Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7: 257-262
- Jack, Jr., C., R., Bennett, D., A., Blennow, K., Carrillo, M., C., Feldman, H., H., Frisoni, G., B., Hampel, H., Jagust, W., J., Johnson, K., A., Knopman, D., S., Petersen, R., C., Scheltens, P., Sperling, R., A., Dubois, B. (2016) A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology.* 87: 539-547

Jack, Jr., C., R., Knopman, D., S., Weigand, S., D., Wiste, H., J., Vemuri, P., Lowe, V., Kantarci, K., Gunter, J., L., Senjem, M., L., Ivnik, R., J., Roberts, R., O., Rocca, W., A., Boeve, B., F., Petersen, R., C. (2012) An operational approach to National Institute on Aging-Alzheimer's Association criteria for preclinical Alzheimer disease. *Ann Neurol.* 71: 765-75

Janelidze, S., Zetterberg, H., Mattsson, N., Palmqvist, S., Vanderstichele, H., Lindberg, O., van, Westen, D., Stomrud, E., Minthon, L., Blennow, K.; Swedish, BioFINDER, study, group, Hansson, O. (2016) CSF A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42/A $\beta$ 38 ratios: better diagnostic markers of Alzheimer disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 3: 154-165

Johnson, G., V., Stoothoff, W., H. (2004) Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci.* 117: 5721-5729

Jonsson, T., Atwal, J., K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P., V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., Hoyte, K., Gustafson, A., Liu, Y., Lu, Y., Bhangale, T., Graham, R., R., Huttenlocher, J., Bjornsdottir, G., Andreassen, O., A., Jönsson, E., G., Palotie, A., Behrens, T., W., Magnusson, O., T., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., Watts, R., J., Stefansson, K. (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature.* 488: 96-99

Karikari, T., K., Benedet, A., L., Ashton, N., J., Lantero, Rodriguez, J., Snellman, A., Suárez-Calvet, M., Saha, Chaudhuri, P., Lussier, F., Kvartsberg, H., Moscoso, Rial, A., Pascoal, T., A., Andreasson, U., Schöll, M., Rosa-Neto, P., Blennow, K., Zetterberg, H. (2021) Diagnostic performance and prediction of clinical progression of plasma phospho-tau181 in the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Mol Psychiatry.* 26: 429–442

Karikari, T., K., Pascoal, T., A., Ashton, N., J., Janelidze, S., Benedet, A., L., Rodriguez, J., L., Chamoun, M., Savard, M., Kang, M., S., Therriault, J., Schöll, M., Massarweh, G., Soucy, J., P., Höglund, K., Brinkmalm, G., Mattsson, N., Palmqvist, S., Gauthier, S., Stomrud, E., Zetterberg, H., Hansson, O., Rosa-Neto, P., Blennow, K. (2020) Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer's disease: a diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. *Lancet Neurol.* 19: 422-433

Katsuno, M., Sahashi, K., Iguchi, Y., and Hashizume, A. (2018) Preclinical progression of neurodegenerative diseases. *Nagoya J Med Sci.* 80: 289–298

Khalil, M., Teunissen, C., E., Otto, M., Piehl, F., Sormani, M., P., Gatteringer, T., Barro, C., Kappos, L., Comabella, M., Fazekas, F., Petzold, A., Blennow, K., Zetterberg, H., Kuhle, J.

(2018) Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 14: 577-589

Khan, S., S., Bloom, G., S. (2016) Tau: the center of a signaling nexus in Alzheimer's disease. *Front Neurosci.* 10: 31

Kilimann, I., Grothe, M., Heinsen, H., Alho, E., J., L., Grinberg, L., Amaro, E., Jr., Dos, Santos, G., A., B., Da, Silva, R., E., Mitchell, A., J., Frisoni, G., B. (2014) Subregional basal forebrain atrophy in Alzheimer's disease: a multicenter study. *J Alzheimers Dis.* 40: 687–700

Klunk, W., E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D., P., Bergström, M., Savitcheva, I., Huang, G., F., Estrada, S., Ausén, B., Debnath, M., L., Barletta, J., Price., J., C., Sandell, J., Lopresti, B., J., Wall, A., Koivisto, P., Antoni, G., Mathis, C., A., Långström, B. (2004) Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol.* 55: 306-319

Kon, T., Tomiyama, M., Wakabayashi, K. (2019) Neuropathology of Lewy body disease: Clinicopathological crosstalk between typical and atypical cases. *Neuropathology.* 40: 30-39

Kosik, K., S. (1993) The molecular and cellular biology fo tau. *Brain Path.* 3: 39-43  
Kuhle, J., Barro, C., Andreasson, U., Derfuss, T., Lindberg, R., Sandelius, Å., Liman, V., Norgren, N., Blennow, K., Zetterberg, H. (2016) Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin Chem Lab Med.* 54: 1655-1661

Lane, C., A., Hardy, J., Schott, J., M. (2018) Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 25: 59-70

Lee, V., M., Balin, B., J., Otvos, L., Jr., Trojanowski, J., Q. (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science.* 251: 675-678

Lewczuk, P., Esselmann, H., Otto, M., Maler, J., M., Henkel, A., W., Henkel, M., K., Eikenberg, O., Antz, C., Krause, W., R., Reulbach, U., Kornhuber, J., Wiltfang, J. (2004) Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF Abeta42, Abeta42/Abeta40 ratio and total tau. *Neurobiol Aging.* 25: 273-281

Lewczuk, P., Lelental, N., Spitzer, P., Maler, J., M., Kornhuber, J. (2015) Amyloid-beta 42/40 cerebrospinal fluid concentration ratio in the diagnostics of Alzheimer's disease: validation of two novel assays. *J Alzheimers Dis.* 43: 183–191

Lewczuk, P., Matzen, A., Blennow, K., Parnetti, L., Molinuevo, J. L., Eusebi, P., Kornhuber, J., Morris, J. C., Fagan, A. M. (2017) Cerebrospinal Fluid A $\beta$ 42/40 Corresponds Better than A $\beta$ 42 to Amyloid PET in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 55: 813-822

Li, D., Mielke, M. M. (2019) An update on blood-based markers of Alzheimer's disease using the SiMoA platform. *Neurol Ther.*, 8: 73-82

Li, J., Q., Tan, L., Wang, H., F., Tan, M., S., Tan, L., Xu, W., Zhao, Q., F., Wang, J., Jiang, T., Yu, J., T. (2016) Risk factors for predicting progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 87: 476-484

Li, X., Coyle, D., Maguire, L., Watson, D. R., McGinnity, T. M. (2011) Gray matter concentration and effective connectivity changes in Alzheimer's disease: a longitudinal structural MRI study. *Neuroradiology.* 53: 733-748

Lindwall, G., Cole, R. D. (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem.* 259: 5301-5305

Llewellyn, D. J., Lang, I. A., Xie, J., Huppert, F. A., Melzer, D., Langa, K. M. (2008) Framingham Stroke Risk Profile and poor cognitive function: a population-based study. *BMC Neurol.* 8: 12

Lovestone, S., Hartley, C. L., Pearce, J., Anderton, B. H. (1997) The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopmental and neurodegenerative processes. *Neuroscience.* 78: 309-324

Mackenzie, I. R., Neumann, M., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Alafuzoff, I., Kril, J., Kovacs, G. G., Ghetti, B., Halliday, G., Holm, I. E., Ince, P. G., Kamphorst, W., Revesz, T., Rozemuller, A. J., Kumar-Singh, S., Akiyama, H., Baborie, A., Spina, S., Dickson, D. W., Trojanowski, J. Q., Mann, D. M. (2010) Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol.* 119: 1-4

Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. (1998) Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 8: 4257

Mattsson, N., Cullen, N. C., Andreasson, U., Zetterberg, H., Blennow, K. (2019) Association Between Longitudinal Plasma Neurofilament Light and Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 76: 791-799

Mattsson, N., Insel, P. S., Palmqvist, S., Portelius, E., Zetterberg, H., Weiner, M., Blennow, K., Hansson, O. (2016) Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.

Cerebrospinal fluid tau, neurogranin, and neurofilament light in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med.* 8: 1184-1196

McKeith, I., G., Boeve, B., F., Dickson, D., W., Halliday, G., Taylor, J., P., Weintraub, D., Aarsland, D., Galvin, J., Attems, J., Ballard, C., G., Bayston, A., Beach, T., G., Blanc, F., Bohnen, N., Bonanni, L., Bras, J., Brundin, P., Burn, D., Chen-Plotkin, A., Duda, J., E., El-Agnaf, O., Feldman, H., Ferman, T., J., Ffytche, D., Fujishiro, H., Galasko, D., Goldman, J., G., Gomperts, S., N., Graff-Radford, N., R., Honig, L., S., Iranzo, A., Kantarci, K., Kaufer, D., Kukull, W., Lee, V., M., Y., Leverenz, J., B., Lewis, S., Lippa, C., Lunde, A., Masellis, M., Masliah, E., McLean, P., Mollenhauer, B., Montine, T., J., Moreno, E., Mori, E., Murray, M., O'Brien, J., T., Orimo, S., Postuma, R., B., Ramaswamy, S., Ross, O., A., Salmon, D., P., Singleton, A., Taylor, A., Thomas, A., Tiraboschi, P., Toledo, J., B., Trojanowski, J., Q., Tsuang, D., Walker, Z., Yamada, M., Kosaka, K. (2017) Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology.* 89: 88-100

McKeith, I., G., Galasko, D., Kosaka, K., Perry, E., K., Dickson, D., W., Hansen, L., A., Salmon, D., P., Lowe, J., Mirra, S., S., Byrne, E., J., Lennox, G., Quinn, N., P., Edwardson, J., A., Ince, P., G., Bergeron, C., Burns, A., Miller, B., L., Lovestone, S., Collerton, D., Jansen, E., N., Ballard, C., de Vos, R., A., Wilcock, G., K., Jellinger, K., A., Perry, R., H. (1996) Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology.* 47: 1113-1124

McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan E., M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 34: 939-944

McKhann, G., M., Knopman, D., S., Chertkow, H., Hyman, B., T., Jack, C., R., Jr., Kawas, C., H., Klunk, W., E., Koroshetz, W., J., Manly, J., J., Mayeux, R., Mohs, R., C., Morris, J., C., Rossor, M., N., Scheltens, P., Carrillo, M., C., Thies, B., Weintraub, S., Phelps, C., H. (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7: 263-269

Mielke, M., M., Syrjanen, J., A., Blennow, K., Zetterberg, H., Vemuri, P., Skoog, I., Machulda, M., M., Kremers, W., K., Knopman, D., S., Jack, C., Jr., Petersen, R., C., Kern,

S. (2019) Plasma and CSF neurofilament light: Relation to longitudinal neuroimaging and cognitive measures. *Neurology*. 93: e252-e260

Mokhtar, S., H., Bakhuraysah, M., M., Cram, D., S., Petratos, S. (2013) The Beta-amyloid protein of Alzheimer's disease: communication breakdown by modifying the neuronal cytoskeleton. *Int J Alzheimers Dis*. 2013: 910502

Mollenhauer, B., Trautmann, E., Taylor, P., Manninger, P., Sixel-Döring, F., Ebentheuer, J., Trenkwalder, C., Schlossmacher, M., G. (2013) Total CSF  $\alpha$ -synuclein is lower in de novo Parkinson patients than in healthy subjects. *Neurosci Lett*. 532: 44-48

Monsell, S., E., Mock, C., Hassenstab, J., Roe, C., M., Cairns, N., J., Morris, J., C., Kukull, W. (2014) Neuropsychological changes in asymptomatic persons with Alzheimer disease neuropathology. *Neurology*. 83: 434-440

Nabizadeh, F., Pourhamzeh, M., Khani, S., Rezaei, A., Ranjbaran, F., Deravi, N.; ADNI. (2022) Plasma phosphorylated-tau181 levels reflect white matter microstructural changes across Alzheimer's disease progression. *Metab Brain Dis*. 37: 761-771

Nedelska, Z., Ferman, T., J., Boeve, B., F., Przybelski, S., A., Lesnick, T., G., Murray, M., E., Gunter, J., L., Senjem, M., L., Vemuri, P., Smith, G., E., Geda, Y., E., Graff-Radford, J., Knopman, D., S., Petersen, R., C., Parisi, J., E., Dickson, D., W., Jack, C., R., Jr, Kantarci, K. (2015) Pattern of brain atrophy rates in autopsy-confirmed dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Aging*. 36: 452-461

Neumann, M., Sampathu, D., M., Kwong, L., K., Truax, A., C., Micsenyi, M., C., Chou, T., T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C., M., McCluskey, L., F., Miller, B., L., Masliah, E., Mackenzie, I., R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H., A., Trojanowski, J., Q., Lee, V., M. (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 314: 130-133

Nishimura, A., L., Zupunski, V., Troakes, C., Kathe, C., Fratta, P., Howell, M., Gallo, J., M., Hortobágyi, T., Shaw, C., E., Rogelj, B. (2010) Nuclear import impairment causes cytoplasmic trans-activation response DNA-binding protein accumulation and is associated with frontotemporal lobar degeneration. *Brain*. 133: 1763-1771

Oboudiyat, C., Glazer, H., Seifan, A., Greer, C., Isaacson, R., S. (2013) Alzheimer's Disease. *Semin Neurol*. 33: 313-329

Olsson, B., Lautner, R., Andreasson, U., Öhrfelt, A., Portelius, E., Bjerke, M., Hölttä, M., Rosén, C., Olsson, C., Strobel, G., Wu, E., Dakin, K., Petzold, M., Blennow, K., Zetterberg, H. (2016) CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 15: 673-684

- Oosterman, J., M., Oosterveld, S., Rikkert, M., G., O., Claassen, J., A., Kessels, R., P. (2012) Medial temporal lobe atrophy relates to executive dysfunction in Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr.* 24: 1474–1482
- Perl, D., P. (2010) Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 77: 32–42
- Petersen, R., C., Smith, G., E., Waring, S., C., Ivnik, R., J., Kokmen, E., Tangalos, E., G. (1997) Aging, memory, and mild cognitive impairment. *Int Psychogeriatr.* 9: 65-69
- Petzold, A. (2005) Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci.* 233: 183-198
- Pihlstrøm, L., Wiethoff, S., and Houlden, H. (2018) Chapter 22 - Genetics of neurodegenerative diseases: an overview. *Handb Clin Neurol.* 145: 309-323
- Portelius, E., Tran, A., J., Andreasson, U., Persson, R., Brinkmalm, G., Zetterberg, H., Blennow, K., Westman-Brinkmalm, A. (2007) Characterization of Amyloid  $\beta$  Peptides in Cerebrospinal Fluid by an Automated Immunoprecipitation Procedure Followed by Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* 6: 4433-4439
- Qin, W., Li, F., Jia, L., Wang, Q., Li, Y., Wei, Y., Li, Y., Jin, H., Jia, J. (2022) Phosphorylated Tau 181 Serum Levels Predict Alzheimer's Disease in the Preclinical Stage. *Front Aging Neurosci.* 14: 900773
- Qiu, C., Kivipelto, M., and von Strauss, E. (2009) Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci.* 11: 111–128
- Rami, L., Sala-Llonch, R., Solé-Padullés, C., Fortea, J., Olives, J., Lladó, A., Peña-Gómez, C., Balasa, M., Bosch, B., Antonell, A., Sanchez-Valle, R., Bartrés-Faz, D., Molinuevo, J., L. (2012) Distinct functional activity of the precuneus and posterior cingulate cortex during encoding in the preclinical stage of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 31: 517-526
- Recuero, M., Serrano, E., Bullido, M., J., Valdivieso, F. (2004) Abeta production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP. *FEBS Lett.* 3: 114-118
- Rhein, V., Eckert, A. (2007) Effects of Alzheimer's amyloid-beta and tau protein on mitochondrial function—role of glucose metabolism and insulin signalling. *Arch Physiol Biochem.* 113: 131-141



Riemenschneider, M., Wagenpfeil, S., Vanderstichele, H., Otto, M., Wiltfang, J., Kretzschmar, H., Vanmechelen, E., Förstl, H., Kurz, A. (2003) Phospho-tau/total tau ratio in cerebrospinal fluid discriminates Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias. *Mol Psychiatry*. 8: 343-347

Roberts, G., W., Gentleman, S., M., Lynch, A., Murray, L., Landon, M., Graham, D., I. (1994) Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 57: 419-425

Roberts, R., Knopman, D., S. (2013) Classification and epidemiology of MCI. *Clin Geriatr Med*. 29: 753-72

Rosengren, L., E., Karlsson, J., E., Karlsson, J., O., Persson, L., I., Wikkelso, C. (1996) Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. *J Neurochem*. 67: 2013-2018

Saito, Y., Kawashima, A., Ruberu, N., N., Fujiwara, H., Koyama, S., Sawabe, M., Arai, T., Nagura, H., Yamanouchi, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., Murayama, S. (2003) Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 62: 644-654

Sanabria-Castro, A., Alvarado-Echeverría, I., Monge-Bonilla, C. (2017) Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: an update. *Ann Neurosci*. 24: 46-54

Selkoe, D., J., Hardy, J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 8: 595-608

Serrano-Pozo, A., Frosch, M., P., Masliah, E., Hyman, B., T. (2011) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1: a006189

Shahani, N., Brandt, R. (2002) Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol Life Sci*. 39: 1668-1680

Shan, D., Wilson, D. (2017) Examining Inflammatory Cytokines in Serum and Plasma. *GEN Magazine*. 37: 18

Sheardova, K., Vyhnalek, M., Nedelska, Z., Laczo, J., Andel, R., Marciniak, R., Cerman, J., Lerch, O., Hort, J. (2019) Czech Brain Aging Study (CBAS): prospective multicentre cohort study on risk and protective factors for dementia in the Czech Republic. *BMJ Open*. 9: e030379

Shoji, M., Golde, T., E., Ghiso, J., Cheung, T., T., Estus, S., Shaffer, L., M., Cai, X., D., McKay, D., M., Tintner, R., Frangione, B., Younkin, S., G. (1992) Production of the Alzheimer amyloid  $\beta$  protein by normal proteolytic processing. *Science*. 258: 126-129

Shoji, M., Kanai, M. (2001) Cerebrospinal fluid Ab40 and Ab42: natural course and clinical usefulness. *J. Alzheimer's Dis.* 3: 313-321

Shoji, M., Matsubara, E., Kanai, M., Watanabe, M., Nakamura, T., Tomidokoro, Y., Shizuka, M., Wakabayashi, K., Igeta, Y., Ikeda, Y., Mizushima, K., Amari, M., Ishiguro, K., Kawarabayashi, T., Harigaya, Y., Okamoto, K., Hirai, S. (1998) Combination assay of CSF tau, A beta 1-40 and A beta 1-42(43) as a biochemical marker of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 158: 134-140

Shoji, M., Matsubara, E., Murakami, T., Manabe, Y., Abe, K., Kanai, M., Ikeda, M., Tomidokoro, Y., Shizuka, M., Watanabe, M., Amari, M., Ishiguro, K., Kawarabayashi, T., Harigaya, Y., Okamoto, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Takeda, M., Urakami, K., Adachi, Y., Nakashima, K., Arai, H., Sasaki, H., Kanemaru, K., Yamanouchi, H., Yoshida, Y., Ichise, K., Tanaka, K., Hamamoto, M., Yamamoto, H., Matsubayashi, T., Yoshida, H., Toji, H., Nakamura, S., Hirai, S. (2002) Cerebrospinal fluid tau in dementia disorders: a large scale multicenter study by a Japanese study group. *Neurobiol Aging.* 23: 363-370

Shulman, K., Herrmann, N., Brodaty, H., Chiu, H., Lawlor, B., Ritchie, K., & Scanlan, J. (2006) IPA survey of brief cognitive screening instruments. *Int. Psychogeriatr.* 18, 281-294

Sperling, R., A., Aisen, P., S., Beckett, L., A., Bennett, D., A., Craft, S., Fagan, A., M., Iwatsubo, T., Jack, C., R., Kaye, J., Montine, T., J., Park, D., C., Reiman, E., M., Rowe, C., C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M., C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., Wagster, M., Phelps, C., H. (2011) Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7: 280-292

Sperling, R., A., Jack, C., R., Jr, Black, S., E., Frosch, M., P., Greenberg, S., M., Hyman, B., T., Scheltens, P., Carrillo, M., C., Thies, W., Bednar, M., M., Black, R., S., Brashear, H., R., Grundman, M., Siemers, E., R., Feldman, H., H., Schindler, R., J. (2011) Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimers Dement.* 7: 367-85

Spillantini, M., G., Goedert, M. (2013) Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 12: 609-622

Štěpánková, H., Nikolai, T., Lukavský, J., Bezdíček, O., Vrajová, M., Kopeček, M. (2015) Mini-Mental State Examination – česká normativní studie. : *Cesk Slov Neurol N.* 78/111: 57-63

The National Institute on Aging and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. (1997) Consensus Recommendations for the Postmortem Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging.* 18: 1-2

Thijssen, E., H., La, Joie, R., Wolf, A., Strom, A., Wang, P., Iaccarino, L., Bourakova, V., Cobigo, Y., Heuer, H., Spina, S., VandeVrede, L., Chai, X., Proctor, N., K., Airey, D., C., Shcherbinin, S., Duggan, Evans, C., Sims, J., R., Zetterberg, H., Blennow, K., Karydas, A., M., Teunissen, C., E., Kramer, J., H., Grinberg, L., T., Seeley, W., W., Rosen, H., Boeve, B., F., Miller, B., L., Rabinovici, G., D., Dage, J., L., Rojas, J., C., Boxer, A., L., Advancing, Research, and, Treatment, for, Frontotemporal, Lobar, Degeneration, (ARTFL), investigators. (2020) Diagnostic value of plasma phosphorylated tau181 in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *Nat Med.* 26: 387-397

Thomann, P., A., Dos, Santos, V., Toro, P., Schönknecht, P., Essig, M., Schröder, J. (2009) Reduced olfactory bulb and tract volume in early Alzheimer's disease—a MRI study. *Neurobiol Aging.* 30: 838–841

Toledo, J., B., Gopal, P., Raible, K., Irwin, D., J., Brettschneider, J., Sedor, S., Waits, K., Boluda, S., Grossman, M., Van, Deerlin, V., M., Lee, E., B., Arnold, S., E., Duda, J., E., Hurtig, H., Lee, V., M., Adler, C., H., Beach, T., G., Trojanowski, J., Q. (2016) Pathological  $\alpha$ -synuclein distribution in subjects with coincident Alzheimer's and Lewy body pathology. *Acta Neuropathol.* 131: 393-409

Trojanowski, J., Q., Lee, V., M., Dawbarn, D., Allen, S., J. (1994) The kinase connection in Paired helical filament tau in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Alzheimer's disease. Am J Pathol.* 144: 449-453

Vanderstichele, H., Bibl, M., Engelborghs, S., Le, Bastard, N., Lewczuk, P., Molinuevo, J., L., Parnetti, L., Perret-Liaudet, A., Shaw, L., M., Teunissen, C., Wouters, D., Blennow, K. (2012) Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement.* 8: 65-73

Vemuri, P., Whitwell, J., L., Kantarci, K., Josephs, K., A., Parisi, J., E., Shiung, M., S., Knopman, D., S., Boeve, B., F., Petersen, R., C., Dickson, D., W., Jack, C., R., Jr. (2008)

Antemortem MRI based SStructural Abnormality iNDex (STAND)-scores correlate with postmortem Braak neurofibrillary tangle stage. *Neuroimage*. 42: 559-567

Vyhnálek, M., Laczó, J., Nikolai, T., Kopeček, M., Baborová, E. (2020) Kognitivní funkce a jejich poruchy. In: *Neuropsychiatrie. Klinický průvodce pro ambulantní i nemocniční praxi*, Uhrová, T., Roth, J. (ed), Maxdorf, Praha, Česká republika, pp. 38-64

Wagner, J., A. (2009) Biomarkers: principles, policies, and practice. *Clin Pharmacol Ther*. 86: 3-7

Wallin, A., K., Blennow, K., Zetterberg, H., Londos, E., Minthon, L., Hansson, O. (2010) CSF biomarkers predict a more malignant outcome in Alzheimer disease. *Neurology*. 74: 1531–1537

Ward, A., Tardiff, S., Dye, C., Arrighi, H., M. (2013) Rate of conversion from prodromal Alzheimer's disease to Alzheimer's dementia: A systematic review of the literature. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 3: 320-332

Yuan, A., Rao, M., V., Veeranna, Nixon, R., A. (2012) Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci*. 125: 3257-3263

Yuan, A., Rao, M., V., Veeranna, Nixon, R., A. (2017) Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 9: a018309