

MAGDALENA GARTYCH, DOROTA BUKOWSKA

Zakład Neurobiologii

Akademia Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu

Królowej Jadwigi 27/39, 61-871 Poznań

E-mail: gartych@awf.poznan.pl

bukowska@awf.poznan.pl

BIOMARKERY PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO W CHOROBY ALZHEIMERA

WSTĘP

Patologiczne procesy biochemiczne zachodzące w organizmie człowieka nie zawsze manifestują się łatwo rozpoznawalną początkową fazą stanu chorobowego. Ponadto, postęp danej choroby prowadzi do wielu zmian strukturalnych i czynnościowych w ustroju. W celu określenia stopnia i charakteru zaburzeń indukowanych obecnością i rozwojem danego schorzenia brane są pod uwagę biomarkery. Marker biologiczny (ang. biomarker) to specyficzna substancja, której obecność lub brak, czy też znaczne różnice zawartości wykrywane w płynach ciała i tkankach przy użyciu powtarzalnych metod, wskazują na nieprawidłowe funkcjonowanie organizmu (SANTOS VIDEIRA 2013). Według Światowej Organizacji Zdrowia biomarker może być nie tylko substancją, ale także strukturą lub procesem, który pozwala przewidzieć wystąpienie choroby. W przypadku choroby Alzheimera (ang. Alzheimer disease, AD) mogą to być biomarkery obecne w tkance nerwowej i płynie mózgowo-rdzeniowym (ang. cerebrospinal fluid, CSF). Ponadto, markery biologiczne AD badane są we krwi (RITTER i CUMMINGS 2015, COUNTS i współaut. 2017, ZETTERBERG 2017), z uwzględnieniem analizy profilu genetycznego pacjenta, jak również ocenia się obecność markerów za pomocą neuroobrazowania (SCHMAND i współaut. 2013, GORDON i współaut. 2016). Zawartość specyficznych markerów biologicznych powinna umożliwiać ujawnienie AD w fazie przedklinicznej oraz określenie ryzyka rozwoju choroby w fazie łagodnych zaburzeń poznawczych (ang. mild cognitive impa-

irment, MCI) (patrz ZBOCH i LESZEK 2010). Uznane już i stale poszukiwane nowe biomarkery AD (JUNTILA 2015, SANTOS VIDEIRA 2013) przyczyniają się do wprowadzania odpowiednich terapii farmakologicznych łagodzących objawy choroby (BLENNOW i współaut. 2006, BARTOSZEWSKA 2008). Niniejsze opracowanie przedstawia dotychczas ustalone i potencjalne biomarkery CSF dla AD.

BIOMARKERY CHOROBY ALZHEIMERA

W Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych (ang. ICD-10) AD oznaczono symbolem G30 i uznano za chorobę neurodegeneracyjną na poziomie molekularnym i anatomicznym, powiązaną ze starzeniem się (RASKIN i współaut. 2015). AD jest chorobą nieuleczalną o wciąż nieustalonych przyczynach i wykrywaną u znacznej części populacji po 65 roku życia (GRZYBOWSKA i współaut. 2015, SCHELTENS i współaut. 2016). Szacuje się, że 50-60% wszystkich chorób otępiennych stanowią przypadki AD. Przewiduje się, że w 2040 r. 81 mln ludzi na świecie dotkniętych będzie objawami demencji (BLENNOW i współaut. 2006). W AD kłębki neurofibrilarnie (ang. neurofibrillary tangles) odkładają się w neuronach, a blaszki starcze (ang. senile plaques) w przestrzeniach pomiędzy nimi. Prowadzi to do utraty neuronów i komunikacji synaptycznej (BARCIKOWSKA-LITWIN 1996). Przejawem tych zmian jest postępujące osłabienie pamięci (amnezja) i zaburzenia innych funkcji poznawczych (afazja, agnozja, apraksja), a w ostatnim etapie choroby wyraźne ograniczenie funkcji życiowych (GRZY-

BOWSKA i współaut. 2015, GAWEL i POTULSKA-CHROMIK 2015). Najcięższą postacią AD powoduje znaczny zanik hipokampa i innych struktur kory mózgowej, również kory śródwchowej (BLENNOW i współaut. 2006). Białki starcze i kłębki neurofibrylarne są charakterystycznymi biomarkerami AD obserwowanymi w badaniach histochemicznych *post mortem* (BARCIKOWSKA-LITIWN 1996). W proces powstawania neurotoksycznych agregatów zaangażowane są: β amyloid (ang. β amyloid, $A\beta$) i białko tau (ARMSTRONG 2009). Istotne różnice stężeń tych substancji odnotowuje się również w CSF (OKONKWO i współaut. 2010, GALASKO 2015). Mniej znanymi i dopiero kandydującymi do roli biomarkerów AD obecnymi w CSF są: rozpuszczalne białko łączące się z receptorem komórek szpiku kostnego (ang. soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 2, sTREM2), białko synaptyczne SNAP-25 (ang. synaptosomal-associated protein 25, SNAP25), enzym odpowiedzialny za cięcie β amyloidu (ang. β -site amyloid precursor cleaving enzyme 1, BACE1). Inne, przypuszczalnie powiązane z procesami neurodegeneracyjnymi substancje to: białko prekursorowe czynnika wzrostu neuronów (ang. protein precursor nerve growth factor, pro-NGF), neurogranina (ang. neurogranin, Ng), białko chitynaza 3 typu 1 (ang. chitinase-3-like protein 1, YKL-40), białko błony neuronu odpowiedzialne za homeostazę jonów wapniowych (ang. visinin like protein 1, VILIP-1), białko związane ze wzrostem-43 (ang. growth-associated protein, GAP-43), ubikwityna (ang. ubiquitin) i podjednostki ciężka, lekka, pośrednia białek neurofilamentów (ang. high, low, medium subunits of neurofilament proteins, NF-H, NF-L, NF-M), również oznaczane w CSF.

PŁYN MÓZGOWO-RDZENIOWY

CSF wytwarzany w spłotach naczyńiówkowych krąży w przestrzeni podpajęczynówkowej omywając mózg i rdzeń kręgowy. Krążenie polega na ukierunkowanym przepływie CSF, ale występuje także przepływ pulsacyjny dwukierunkowy, a lokalnie dochodzi do wymiany składników między krwią, płynem śródmiąższowym i CSF (BRINKER i współaut. 2014). Najnowsze dane potwierdzają, że w chorobach neurodegeneracyjnych z nieprawidłowym krążeniem CSF związane są procesy zapalne naczyń krwionośnych i zaburzenia funkcji fagocytarnych komórek mikrogleju (SWEENEY i współaut. 2015, SIMON i ILIFF 2016). Ponadto, w AD przepływ CSF w strukturach mózgowia jest ograniczony, co hamuje efektywne usuwanie z nich szkodliwych metabolitów na skutek zwiększenia się przestrzeni wypełnionej płynem

(JOHANSON i współaut. 2008). Oprócz zaburzeń cyrkulacji CSF w AD istotny jest także zmieniony skład płynu, dlatego wykonuje się oznaczenia zawartości białek markerowych (RITTER i CUMMINGS 2015). Najczęściej stosowaną metodą pobrania CSF jest wkłucie lędźwiowe (PAPALIAGKAZ 2013, MENÉNDEZ-GONZÁLEZ 2014). Pozyskany CSF poddaje się testom biochemicznym takim jak ELISA i xMAP Luminex (VANDERSTICHELE i współaut. 2012, WANG i współaut. 2012). Metody immunoenzymatyczne są włączane na stałe do szeregu badań przeprowadzanych w kierunku potwierdzenia AD, przede wszystkim w fazie MCI (DINIZ i współaut. 2008, COUNTS i współaut. 2017). Obecność w CSF uznanych lub potencjalnych markerów biologicznych AD umożliwia wykluczenie już na etapie wstępnym innych schorzeń otępiennych, takich jak zespół Picka czy choroba Parkinsona (JOHANSON i współaut. 2008, HU i współaut. 2010, PAPALIAGKAZ 2013). Stężenia biomarkerów w CSF uznaje się więc za znaczące w diagnozowaniu różnicującym chorób ośrodkowego układu nerwowego o klinicznie podobnych objawach.

BIOMARKERY AD WE KRWI

Wspomniane wyżej wkłucie lędźwiowe w celu pobrania CSF jest procedurą inwazyjną i posiadającą liczne ograniczenia. Dotyczy to szczególnie pacjentów w podeszłym wieku. Ograniczone są także możliwości wielokrotnego pobierania CSF koniecznego do monitorowania efektów leczenia. Z tego względu prowadzone są intensywne badania w celu identyfikacji aktualnie stosowanych i potencjalnych biomarkerów CSF we krwi. Szczegółowy przegląd literatury i metaanaliza danych dotyczących zawartości biomarkerów AD zarówno w CSF, jak i w osoczu oraz surowicy zostały przedstawione przez OLSSON i współaut. (2016). Znaczącymi biomarkerami CSF w diagnostyce AD (oszacowanymi w oparciu o wielkość efektu), a omawianymi w obecnej pracy, są całkowita zawartość białka tau (ang. total tau, t-tau), NF-L, zawartość ufosforylowanego białka tau (ang. phosphorylated tau, p-tau) i β amyloidu₄₂ (ang. β amyloid₄₂, $A\beta_{42}$), w dalszej kolejności VILP-1, YKL-40. Spośród wymienionych biomarkerów obecnych we krwi i CSF (t-tau, YKL-40, $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$), jedynie poziom t-tau został wskazany jako istotny statystycznie. Jednak należy zwrócić uwagę, iż wysoki poziom białka tau i NF-L we krwi nie jest specyficzny dla AD (BLENNOW 2017). W innym badaniu AD z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych stężenie białka t-tau w osoczu było około dwukrotnie wyższe w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej bez zaburzeń poznaw-

czych, natomiast w CSF wzrost jego stężenia był wyraźny (metoda ELISA), ale nie wykazano korelacji między zawartością t-tau w osoczu i w CSF (ZETTERBERG i współaut. 2013). Jako inne potencjalne biomarkery AD we krwi uwzględnia się między innymi markery stanu zapalnego, np. receptor czynnika martwicy nowotworu (ang. TNF receptor), markery uszkodzeń neuronalnych i naczyniowych, takich jak ceramidy, sfingomieliny i sulfatydy, a także cząsteczki adhezji, np. wewnątrzkomórkowej 1 (ang. ICAM-1) lub naczyniowej 1 (ang. VCAM-1) (patrz SNYDER 2014).

MODELE ZWIERZĘCE AD

U człowieka i modelowych zwierząt transgenicznych (ang. transgenic animal models, Tg) mutacje w genach kodujących białko prekursorowe β amyloidu (ang. amyloid protein precursor, APP) oraz preseniliny 1 i 2 (ang. presenilin 1,2; PSEN1, PSEN2) są badane jako przyczyny dziedziczenia AD. Ponadto, czynnikiem ryzyka AD jest allel $\epsilon 4$ genu kodującego apolipoproteinę E (ang. apolipoprotein 4, ApoE4), mający znaczenie w występowaniu sporadycznej postaci tej choroby (LA FERLA i GREEN 2012, CAVANAUGH i współaut. 2014, MEHRABIAN i współaut. 2015, SCHELTENS i współaut. 2016, KUMAR i współaut. 2016). Efekty mutacji genów u Tg są brane pod uwagę w przewidywaniu przebiegu i skutków AD u ludzi, jednak tło genetyczne obu grup organizmów nie jest identyczne (SABBAGH i współaut. 2013, WOJDA i KUZNICKI 2013, FAROOQUI 2016). Ponadto, modele zwierzęce AD wykazują wiele innych ograniczeń (WOJDA i KUZNICKI 2013). Wynikają one z mniej zaawansowanego niż ludzki poziomu rozwoju układu nerwowego, tak jak u muszki owocowej (PRÜßING i współaut. 2013) i danio pręgowanego (NERY i współaut. 2014) oraz wydłużonego czasu rozwoju zmian neurozwyrodnieniowych, obserwowanych u ssaków, m.in. psów (HEAD i współaut. 2010). Wymienione czynniki decydują o odmiennym przebiegu procesów biochemicznych w układzie nerwowym zwierząt modelowych i osób z AD. Pomimo tych ograniczeń, przede wszystkim modele transgenicznych gryzoni pełnią ważną rolę w badaniach nad patogenezą AD (NAZEM i współaut. 2015, SALARI i BAGHERI 2016). Stanowią one alternatywę dla analiz z wykorzystaniem ludzkich tkanek ośrodkowego układu nerwowego (*post-mortem*) oraz komórek macierzystych i krwinek człowieka (WOJDA i KUZNICKI 2013). Ponadto, wyniki badań stosowanych biomarkerów AD, tj. $A\beta$ i białka tau prowadzone na gryzoniach jako Tg, mogą pomóc zarówno w ustaleniu przyczyn, jak i

skuteczniejszych poszukiwaniach idealnych markerów biologicznych tej choroby.

W modelu mysim Tg2576 i u pacjentów z AD obserwuje się obniżoną zawartość $A\beta_{42}$ w CSF (SABBAGH i współaut. 2013). Jednak w innych mysich Tg (APP23, APP24 i APP51), które wykazują ekspresję ludzkiego APP, odnotowano 20–30% wzrost zawartości $A\beta_{42}$ i β amyloidu₄₀ (ang. β amyloid₄₀, $A\beta_{40}$) w CSF, lecz tylko w fazie pojawienia się pierwszych blaszek amyloidowych w tkance nerwowej (MAIA i współaut. 2015). Ponadto, w modelu mysim ICR, który został indukowany chemicznie poprzez dokomorową iniekcję monomerów $A\beta_{1-42}$, uzyskano proporcjonalny i zależny od dawki wzrost ich poziomu zarówno w CSF, jak i w osoczu. Na tej podstawie postuluje się znaczącą rolę tego modelu w rozwoju badań nad biomarkerami AD obecnymi we krwi (CHO i współaut. 2014). Myszy jako Tg, z mutacją w genie kodującym APP, u których można identyfikować biomarkery CSF, porządkuje opracowanie SASAGURI i współaut. (2017). Z kolei w szeregu innych modelach mysich Tg, obserwuje się wzrost poziomu t-tau w CSF oraz zaburzenia funkcji pełnionych przez białko tau analogicznie jak u człowieka (BARTEN i współaut. 2011). Dodatkowo oszacowano, że w modelu mysim rTg4510 stężenie p-tau 181 (pT181) dwukrotnie wzrasta w CSF u starszych myszy. Efekt ten jest przypuszczalnie związany z takimi samymi zaburzeniami w funkcjonowaniu synaps i deficytem poznawczym, które przejawiają się u pacjentów z AD (SANKARANARAYANAN i współaut. 2015).

Badania prowadzone na Tg z wykorzystaniem szczurów obejmują kilka modeli. Model TgAPPswe charakteryzuje się wzrostem poziomu izoform amyloidowych w tkance nerwowej około 6-12 miesiąca życia, jednak dobrymi wynikami testów orientacji przestrzennej (labirynt Morrisa); UKUR25, w porównaniu z powyższym modelem, zawiera dodatkową mutację M146L genu PSEN1 i cechuje się postępującą od 6 miesiąca życia wzmożoną kumulacją $A\beta$ w korze mózgowej i w hipokampie, oraz wykazuje w testach behawioralnych postępujące zaburzenia poznawcze; Tg6590 prezentuje znacznie zwiększone gromadzenie się $A\beta$ w tkance nerwowej, co powyżej 9 miesiąca życia skutkuje zaburzeniami uczenia się i pamięci (patrz BENEDIKZ i współaut. 2009). Zarówno powyższe, jak i inne opracowania (patrz FAROOQUI 2016), nie przedstawiają wyników badań uznanych biomarkerów CSF u szczurów wymienionych jako Tg. Wiadomo natomiast, że u szczurów Tau Tg, jak również w AD u człowieka, odnotowuje się zwiększony poziom białka p-tau w CSF (SABBAGH i współaut. 2013).

UZNANE BIOMARKERY AD W CSF

U podstaw AD leżą procesy neurodegeneracyjne. Przyjmuje się, że są one spowodowane między innymi odkładaniem się peptydu A β i białka tau w tkance nerwowej człowieka, co przekłada się na ich odpowiednio obniżone lub zwiększone stężenie w CSF. Hipotezy dotyczące choroby obejmujące molekularne procesy kaskady amyloidowej lub białka tau nie są do tej pory całkowicie wyjaśnione (BARTOSZEWSKA 2008). Zawartość A β_{42} i t-tau w CSF, obok depozytów blaszek starczych i kłębków neurofibrilarnych w tkance nerwowej, jest nie tylko ważnym wskaźnikiem prognostycznym AD, ale pozwala także określić stopień zaawansowania choroby (SKILLBÄCK i współaut. 2015). Obie substancje zostały uznane za klasyczne biomarkery CSF dla AD i są już szczegółowo opisane w literaturze (PAPALIAGKAS 2013, SANTOS VIDEIRA 2013). Progi diagnostyczne zawartości A β_{42} i t-tau w CSF wynoszą dla odmiennych metod badawczych, xMAP Luminex i ELISA, odpowiednio: A β_{42} – 192 pg/ml, t-tau – 93 pg/ml (OKONKWO i współaut. 2010) i A β_{42} – 500 pg/ml, t-tau – 450 pg/ml (LANARI i PARNETTI 2009, TOLEDO i współaut. 2012). A β_{42} powstaje z transbłonowej glikoproteiny, prekursora β amyloidu (APP, APP β) (MARSZAŁEK 2016). Fizjologiczna rola APP β nie została dotychczas dokładnie poznana. Widomo, że APP β ulega cięciu przez enzymy proteolityczne nazwane sekretazami (DE STROOPER i współaut. 2010). W AD dominuje amyloidogeny szlak trawienia APP β z udziałem β -sekretazy (BACE1), a następnie γ -sekretazy (MARSZAŁEK 2016). Skutkiem kaskady procesów z udziałem APP β i sekretaz jest powstanie szkodliwych dla neuronów izoform: A β_{40} , A β_{42} . W neuropilu, wokół ciał komórek nerwowych, a przede wszystkim w obrębie ścian naczyń krwionośnych następuje agregacja A β_{40} i A β_{42} w blaszki starcze złożone w większości z A β_{42} i dystroficznych neurytów (ARMSTRONG 2009, BARCIKOWSKA-LITWIN 1996). Za efektywne usuwanie niszczonego neuronu A β z tkanki mózgu odpowiedzialne są dwa enzymy wchodzące w skład kompleksu ubikwityna-proteasom: neprylizyna i enzym degradujący insulinę (BARTOSZEWSKA 2008). Istotna jest również rola astrogleju w prawdopodobnym tworzeniu cytoprotekcyjnej blizny gęłowej wokół blaszek starczych oraz funkcja fagocytarna mikrogleju w eliminowaniu A β ze struktur ośrodkowego układu nerwowego (BARCIKOWSKA-LITWIN 1996). Wykazano pozytywną korelację między podwyższeniem stężenia A β_{42} w korze mózgu i jego obniżeniem w CSF (ZBOCH i LESZEK 2010). Stężenia A β_{42} w CSF oznaczone przy użyciu odmiennych me-

tod badawczych wynosiły u osób zdrowych 205,6 pg/ml (xMAP Luminex) oraz 554,7 pg/ml (ELISA), natomiast u osób chorych na AD odnotowano znacznie niższe stężenia tego peptydu, odpowiednio do 143,5 pg/ml i 287,1 pg/ml (OKONKWO i współaut. 2010, TOLEDO i współaut. 2012). Należy dodać, że badane grupy nie były jednolite pod względem płci i wieku, a wyższy poziom A β_{42} zawartego w CSF pacjentów z AD stwierdzono u mężczyzn przed 65 rokiem życia, w porównaniu do kobiet w tym samym wieku, co świadczy o różnicach międzypłciowych w tej grupie (KNAPSKOG i współaut. 2016). Z kolei białko tau jest w warunkach fizjologicznych wolną transferryną, a izoformy o nieprawidłowej konformacji odkładają się w neuronach powodując powstawanie kłębków neurofibrilarnych (ARMSTRONG 2009, KHAN i BLOOM 2016). Białko tau o zmienionej strukturze przestrzennej zaburza transport aksonalny warunkowany przez mikrotubule. To świadczy o znacznych uszkodzeniach neuronalnych, pojawiających się między innymi w AD (ZBOCH i LESZEK 2010). Patologiczne zmiany neuronów jakie powoduje białko tau określane są jako tauopatie (AVILA i współaut. 2016). W CSF oznacza się zawartość t-tau, jak również ufosforylowanych form białka p-tau (HAMPEL i współaut. 2003, KHAN i BLOOM 2016). Badania immunoenzymatyczne z wykorzystaniem metod xMAP Luminex i ELISA wskazują na około dwukrotne podwyższenie stężenia białka t-tau u osób z AD, odpowiednio 121,6 pg/ml i 547,1 pg/ml w stosunku do wartości u osób zdrowych, odpowiednio 65,6 pg/ml i 226,6 pg/ml (OKONKWO i współaut. 2010, TOLEDO i współaut. 2012). Odnotowany wzrost stężeń białek t-tau oraz p-tau w CSF jest przydatny w bardziej skutecznym rozróżnianiu chorób otępiennych (HAMPEL i współaut. 2003, HU i współaut. 2010).

POTENCJALNE BIOMARKERY AD W CSF

TREM2 I STREM2

Białko TREM2 jest transbłonową glikoproteina, receptorem występującym w mikrogleju i aktywowanym podczas fagocytozy (PICCIO i współaut. 2016, VILLEGAS-LLERENA i współaut. 2016). Ekspresja TREM2 warunkuje również prawidłowe funkcjonowanie komórek szpiku kostnego odpowiedzialnych za wrodzoną odporność (HENJUM i współaut. 2016). Wysoki poziom ekspresji białka TREM2 koreluje z 2–4 krotnym wzrostem ryzyka AD u osób z zaburzeniami poznawczymi (ULRICH i HOLTZMAN 2016). Wskutek proteolitycznego cięcia białka typu 1 TREM2, powstaje roz-

puszczalne białko sTREM2 uwalniane do CSF. sTREM2 w warunkach fizjologicznych odpowiada za eliminację $A\beta_{42}$ i uszkodzonych neuronów (SUÁREZ-CALVET i współaut. 2016). Prawdopodobnie w AD stężenie sTREM2 w CSF wzrasta w odpowiedzi na wzmożoną kumulację związków neurotoksycznych. W badaniach wykonanych metodą ELISA potwierdzono podwyższony poziom sTREM2 w CSF u osób z AD po 70 roku życia w granicach 200–250 pg/ml, natomiast u osób w tym samym wieku bez AD poniżej 200 pg/ml (PICCIO i współaut. 2016). Wykazano również pozytywną korelację między stężeniem sTREM2 (w grupie kontrolnej 195,6 pg/ml, w grupie AD 231,2 pg/ml) a zawartością w CSF typowych biomarkerów procesów neurodegeneracyjnych (obniżona zawartość $A\beta_{42}$ i podwyższona białka tau), oszacowanymi przy użyciu biotestów ELISA (HESLEGRAVE i współaut. 2016). W innych badaniach odnotowano zwiększoną zawartość sTREM2 w CSF u grup pacjentów w przedklinicznej fazie AD, MCI-AD i AD z otępieniem (wyodrębnionych w oparciu o płeć, wiek, wyniki testu MMSE, zawartość uznanych biomarkerów CSF, genotyp ApoE), w porównaniu z grupą kontrolną (bez AD). Natomiast u pacjentów grupy kontrolnej wykazano słabą korelację stężenia sTREM2 z wiekiem, jako czynnikiem zwiększonego ryzyka AD (CHENG i współaut. 2016, HENJUM i współaut. 2016). Jednak nie wykazano istotnie statystycznych różnic w zawartości tego biomarkera pomiędzy pozostałymi grupami, to jest MCI i AD (HENJUM i współaut. 2016). Mechanizm procesów z udziałem sTREM2, prowadzących do usuwania obumarłych neuronów, nie został dotychczas poznany. Inhibitory białka sTREM2 w rozwoju wczesnej fazy choroby mogłyby posłużyć jako ważne czynniki monitorujące efektywność odpowiedzi przeciwzapalnej w leczeniu AD (ULRICH i HOLTZMAN 2016). Dodatkowo, u osób w przedklinicznej fazie AD, sTREM2 jako kandydat do roli biomarkera byłby wskaźnikiem zmian otępiennych znacznie wcześniej zachodzących w mózgu pacjentów z tą chorobą (SCHINDLER i HOLTZMAN 2016, HENJUM i współaut. 2016).

SNAP-25

SNAP-25 jest białkiem zlokalizowanym w błonie komórkowej neuronów i występującym także w CSF. Jest jednym z białek odpowiadających za fuzję błony komórkowej pecherzyków zawierających neuroprzekaznik z błoną presynaptyczną w obrębie synapsy. Jako białko transbłonowe stanowi część kompleksu t-SNARE, który przeciwdziała neurodegeneracji (BRINKMALM i współaut. 2014). Trzy typy białek kompleksu t-SNARE: synaptobrewina, zlokalizowana w pe-

cherzykach synaptycznych, oraz syntaksyna i SNAP-25 (białka błony presynaptycznej), tworzą fuzyjny agregat niezbędny w procesie egzocytozy neurotransmiterów (XU i współaut. 2013). Prowadząc badania na modelach zwierzęcych AD uznano, że zmniejszona zdolność wiązania się SNAP-25 z syntaksyną wynika z ograniczenia glutaminergicznego przekazywania nerwowego (HONER i współaut. 2012). Przy użyciu tandemowej spektrometrii masowej (ang. LC-MS/MS) wykazano, że w zaawansowanym stadium AD stężenie SNAP-25 w CSF jest zwiększone (wartości średnie w grupie kontrolnej: ~25 pg/ml, u osób z AD: ~45 pg/ml) (BRINKMALM i współaut. 2014). Odmienne, w przypadku otępienia naczyniowego (ang. vascular dementia, VaD) w obrębie kory skroniowej pacjentów badanych *post mortem* (test podwójnego wiązania ELISA; ang. sandwich ELISA) odnotowano obniżenie stężenia SNAP-25; w grupie kontrolnej zawartość tego białka wynosiła 380 pg/ml, a w grupie z VaD została zredukowana do 170 pg/ml (SINCLAIR i współaut. 2015). Ze względu na pozytywną korelację z poziomem białka t-tau, zmieniona zawartość SNAP-25 jest prawdopodobnie istotna także w przypadku tauopatii (BRINKMALM i współaut. 2014). Ważną rolę w utrzymaniu prawidłowej konformacji SNAP-25 ma białko chaperonowe CSP (ang. cysteine string protein, CSP). Funkcją opiekuńczego białka CSP jest zapewnienie przez kompleks SNARE (w tym SNAP-25) niezaburzonego procesu fuzji błony pecherzyków wypełnionych neurotransmiterem z błoną presynaptyczną (BURGOYNE i MORGAN 2015).

BACE1

Wnikliwie badany potencjalny biomarker BACE1 jest głównym enzymem, β -sekreazą (inaczej proteazą aspartylową 2), zaangażowanym w proces powstawania $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$ (DE STROOPER i współaut. 2010, MULDER i współaut. 2010). Stwierdzono, że im wyższy poziom BACE1 w CSF, tym wyższe prawdopodobieństwo wystąpienia MCI i AD (HAMPEL i SHEN 2010). Metodą ELISA oznaczono podwyższoną zawartość BACE1 w CSF u osób z AD wynoszącą >20 pg/ml, u pacjentów bez AD ~16 pg/ml. Ponadto, pozytywna korelacja stężenia tego potencjalnego biomarkera z zawartością $A\beta_{40}$, t-tau oraz p-tau (lecz nie z $A\beta_{42}$) wskazuje na związek aktywności BACE1 z kluczowymi biomarkerami CSF u pacjentów z AD (MULDER i współaut. 2010). Oznaczenie BACE1 w CSF jest istotne w detekcji AD w początkowym stadium choroby, zwłaszcza w stadium przed wystąpieniem jej typowych symptomów (HAMPEL i SHEN 2010). Modulacja aktywności ubikwityny, która hamuje działanie BACE1 jest wykorzystywa-

na w terapii tłumiącej objawy u chorych z AD (FUNMLAYO i współaut. 2016). Sugeruje się również, że mogłyby być stosowane leki z klasy peptydomimetyków (niskocząsteczkowe inhibitory BACE1), jednak ich działanie terapeutyczne dotychczas nie jest całkowicie skuteczne, między innymi ze względu na problem pokonania bariery krew-mózg przez cząsteczki leku (DE STROOPER i współaut. 2010).

PRO-NGF

Białko prekursorowe czynnika wzrostu neuronów warunkuje procesy różnicowania neuronów, ich prawidłową trofję i regenerację aksonów. Metodą testu podwójnego wiązania ELISA wykazano, że stężenie pro-NGF w CSF jest podwyższone (MCI o 55%, AD o 70%) i koreluje pozytywnie z wynikami testów psychologicznych. Zatem pro-NGF, jako potencjalny biomarker AD, mógłby być użyteczny w prognozowaniu wczesnego stadium choroby (COUNTS i współaut. 2016).

NG I YKL-40

Neurogranina (Ng) i YKL-40 to białka synaptyczne, odpowiadające za procesy neurozapalne oraz wiązanie kalmoduliny pobudzającej wiele receptorów błonowych (HELLWIG i współaut. 2015). Udowodniono, że Ng występuje w neuronach tych samych obszarów, które narażone są na procesy neurodegeneracyjne w AD, między innymi w hipokampie (WELLINGTON i współaut. 2016). Ekspresja Ng i YKL-40 w CSF świadczy o uszkodzeniach neuronów i aktywacji mikrogleju, co przekłada się na obniżenie zdolności poznawczych (PORTELIUS i współaut. 2015, HELLWIG i współaut. 2015). Wykazano, że wzrastający poziom Ng i białka tau w CSF jest charakterystyczny dla MCI (THORSELL i współaut. 2010). Podwyższone stężenie Ng odnotowano wyłącznie w AD (jak również w MCI) i nie występuje ono w innych chorobach neurodegeneracyjnych, np. chorobie Parkinsona (WELLINGTON i współaut. 2016). Trzykrotnie wyższe stężenie Ng i dwukrotnie wyższe stężenie YKL-40 w CSF oznaczone metodą ELISA stwierdzono u pacjentów z AD, w porównaniu z pacjentami z MCI, u których nie zdiagnozowano AD (HELLWIG i współaut. 2015). Potwierdzono wzrost stężenia Ng i t-tau pozytywnie skorelowanego z zawartością A β w poszczególnych fazach AD w stosunku do osób zdrowych, w przeciwieństwie do stężenia NF-L w CSF, gdzie takiej zależności nie wykazano (MATSSON i współaut. 2016). Prognozuje się, że Ng występująca w CSF zostanie wkrótce uznana biomarkerem AD (BLENNOW 2017, DE VOS i współaut. 2015).

VILIP-1

VILIP-1 jest białkiem błony neuronów uwalnianym również do CSF, które odpowiada za homeostazę jonów wapnia, a jej zaburzenia powodują procesy zapalne prowadzące do utraty neuronów (GROBLEWSKA i współaut. 2015). Wzrost stężenia VILIP-1 powyżej ~50 pg/ml w CSF (metoda ELISA) świadczył o AD, a skorelowany z wartościami oznaczonymi dla otępienia z ciałami Lewy'ego (ang. dementia with Lewy bodies) stanowił czynnik różnicujący te dwie choroby (LUO i współaut. 2013). Poziom VILIP-1 jest istotny w diagnostyce otępienia czołowo-skroniowego (ang. frontotemporal dementia, FTD) i jak się przypuszcza, może stać się biomarkerem AD oznaczanym w korze śródwchowej (JÓZWIĄK 2008, KIRKWOOD i współaut. 2016).

GAP-43

Białko związane ze wzrostem-43 (GAP-43), znane także pod nazwą neuromodulina, jest składnikiem błony presynaptycznej neuronów w obszarach korowych i podkorowych mózgu. Funkcja tego białka jest związana z rozwojem, funkcjonalną modulacją połączeń neuronalnych (plastyczność synaptyczna) i regeneracją aksonów. Jego zróżnicowany poziom w obszarach mózgowia odzwierciedla różne możliwości reorganizacji strukturalnej i czynnościowej (BENOWITZ i współaut. 1989). W mózgach zmarłych pacjentów z AD, przy użyciu techniki immunohistochemicznej, zaobserwowano istotną redukcję poziomu GAP-43 w korze płata czołowego (70% wartości kontrolnej, $p < 0.01$) i niektórych obszarach hipokampa (81% wartości kontrolnej, $p < 0.05$). Są to okolice włączone w mechanizmy pamięci i innych funkcji poznawczych, w których zawartość tego białka w warunkach prawidłowych jest wysoka. W przeciwieństwie do hipokampa, w korze czołowej wykryto istotną negatywną korelację pomiędzy GAP-43 i trwaniem otępienia ($r = -0.58$; $p < 0.02$). Z kolei, istotną pozytywną korelację wykazano pomiędzy GAP-43 i liczbą płytek starczych w hipokampie ($r = 0.64$; $p < 0.05$). Ponieważ GAP-43 jest zaangażowane w utrzymanie sprawności synaps i w proces regeneracji aksonów, sugeruje się, że obniżony poziom GAP-43 w korze czołowej jest konsekwencją zwyrodnienia synaptycznego, natomiast w płytkach starczych hipokampa aktywność GAP-43 może być związana z procesem rozgałęziania (ang. sprouting) aksonów (BOGDANOVIC i współaut. 2000). Podobnie jak wcześniej wspomniane białka związane z synapsą (SNAP-25 i Ng), również GAP-43 jest wydzielany do CSF i może być identyfikowany i mierzony. U chorych z AD wykazano wzrost poziomu GAP-43 w CSF w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0.05$).

i do osób z FTD ($p < 0.01$). Odnotowano też wysoce istotną korelację pomiędzy zawartością GAP-43 i t-tau, i niektóre wyniki sugerują, że stosunek GAP-43/t-tau może mieć duże znaczenie w monitorowaniu zwyrodnienia aksonalnego (SJÖGREN i współaut. 2000, 2001). Najnowsze badania, które koncentrowały się na analizie profili białek w CSF w odniesieniu do kilku chorób neurodegeneracyjnych, wykazały w AD podwyższony poziom zarówno GAP-43, jak i Ng w próbkach pobranych z komórek mózgu *post mortem* i zbiornika łądźwiowego *antemortem* (przyżyciowo). Wzrost poziomu tych białek odnotowano także u pacjentów, u których diagnoza AD nie była jeszcze ustalona w momencie pobrania płynu (REMNEŠTAL i współaut. 2016). W świetle powyższych doniesień, wzrost poziomu GAP-43 w CSF i obniżenie jego zawartości w tkance mózgu może być efektem wyciekania tego białka do CSF z powodu degeneracji synaps. Sugeruje się też, iż podwyższenie GAP-43 w CSF odzwierciedla odpowiedź adaptacyjną wynikającą z utraty połączeń synaptycznych.

UBIKWITYNA

Ubikwityna jest niewielkim białkiem złożonym z 76 aminokwasów, zaangażowanym w proces samooczyszczania komórki (tzw. kontrolowana degradacja). Ubikwityna przyłącza się wiązaniem kowalencyjnym do białek przeznaczonych do degradacji w procesie zależnym od ATP. To stanowi sygnał zapoczątkowujący degradację białka przez proteazy. Istnieje w komórkach szlak odpowiedzialny za usuwanie nieprawidłowo zwiniętych białek (ang. misfolded proteins), w którym uczestniczy ubikwityna (ang. ubiquitin-proteasome system). W AD ten komórkowy „system kontroli jakości” jest zaburzony, co prowadzi do gromadzenia się nieprawidłowo zwiniętych i opornych na proteazy agregatów białkowych w komórkach i w przestrzeniach pomiędzy nimi (LECKER i współaut. 2006, CIECHANOVER i współaut. 2015). Istnieją dowody na ścisłe związki pomiędzy A β i systemem ubikwityna-proteasom, odgrywające istotną rolę w patogenezie AD (HONG i współaut. 2014). W mózgu osób z AD ubikwityna jest obecna w kłębkach neurofibrilarnych i aksonach towarzyszących płytkom starczym. Sugeruje się, że ubikwityna jest związana z włóknkami w kłębkach neurofibrilarnych i płytkach starczych, zatem jej rola w usuwaniu tych włóknkowych struktur w mózgu chorych na AD może być nieskuteczna (PERRY i współaut. 1987). W nowszych badaniach w materiale autopsyjnym AD z użyciem metody immunohistochemicznej wykazano akumulację ubikwityny w płytkach starczych i kłębkach

neurofibrilarnych, której zawartość pozwoliła na ocenę stadium choroby (odróżnienie zmian w AD od wczesnej postaci AD) (CHU i współaut. 2000). W innych badaniach porównywano zawartość ubikwityny w CSF i surowicy pacjentów z AD i VaD oraz u ludzi zdrowych. Stwierdzono, iż stosunek zawartości ubikwityny w CSF do jej zawartości w surowicy różnił się u pacjentów i osób zdrowych. W przypadkach AD stosunek wynosił 22 do 29 (76%), a w przypadkach z VaD 9 do 14 (64%), i był wyższy niż najwyższa wartość zanotowana u osób zdrowych. Jednak porównanie wyników chorych na AD i VaD nie wykazało żadnych znaczących różnic (BLENNOW i współaut. 1994). Podwyższony poziom ubikwityny w CSF w AD, odzwierciedla zwiększoną zawartość tego białka w mózgu. Nowsze badania wykazały, że poziom ubikwityny w CSF był znacząco wyższy u chorych na AD ($p < 0.0001$), w porównaniu z osobami z innymi formami demencji, chorobami neurologicznymi i osobami zdrowymi. Zaobserwowano znaczącą pozytywną korelację pomiędzy ubikwityną, tau i ApoE4, podczas gdy korelacja z A β_{42} była negatywna. Porównanie skali zależności pomiędzy ubikwityną a diagnozą AD wykazało, że wysoki poziom ubikwityny jest specyficzny dla AD. Dostarczono także dowodów na statystycznie znaczące powiązanie ubikwityny z patologią AD. Ponadto wykazano, iż rola ubikwityny jako diagnostycznego markera jest porównywalna z zawartym w CSF A β_{42} , tau lub ApoE4 (KANDIMALLA i współaut. 2014).

BIĄŁKA NEUROFILAMENTÓW

Złożone z białek neurofilamenty stanowią komponenty budowy aksonu i są swoiste dla neuronów. Białka neurofilamentów ulegają fosforylacji, która reguluje ich funkcję w transporcie aksonalnym i tendencję do polimeryzacji. W zależności od ciężaru cząsteczkowego wyróżnia się trzy podjednostki białkowe neurofilamentów: ciężką (NF-H), pośrednią (NF-M) i lekką (NF-L). W AD podjednostki te ulegają hiperfosforylacji, a ich zawartość w mózgu i CSF jest podwyższona. Poziom białek neurofilamentów jest odzwierciedleniem obumierania neuronów i ubytku aksonów kory mózgu, cech patologicznych w przypadkach demencji. W CSF poziomy zarówno ufosforylowanych NF-H/M i nieufosforylowanych NF-H/M były znacząco wyższe (odpowiednio, 12–24 razy i 3–4 razy) u osób starszych i zdrowych neurologicznie w porównaniu do osób młodych z grupy kontrolnej. Ponadto, w AD poziomy nieufosforylowanych NF-H/M i NF-L były zbliżone do poziomów w VaD, ale wyższe niż u osób dobranych wiekowo z grupy kontrolnej. Interesujący był też wynik, który wskazał na

znacząco wyższy poziom ufosforylowanego NF-H/M w AD w stosunku do badanych z grupy kontrolnej oraz do osób zarówno wykazujących nie związane z AD zaburzenia neurologiczne, jak i ze zdiagnozowaną VaD. Zatem, poziomy podjednostek białkowych, szczególnie ufosforylowanego NF-H/M wykrytego w CSF, umożliwiła odróżnienie AD od normalnego starzenia się mózgu, jak również od VaD i innych zaburzeń neurologicznych (HU i współaut. 2002). Z kolei, podwyższenie poziomu NF-L i NF-H w CSF w przypadku AD nie jest swoiste wyłącznie dla tej choroby, ponieważ również w FTD i VaD zaobserwowano wzrost ich poziomu w porównaniu z osobami zdrowymi neurologicznie. Jednak ze względu na oszacowany niewielki efekt, autorzy nie zalecają zastosowania NF-L i NF-H w diagnostyce demencji, ale wskazują, iż ocena poziomu obu białek może być wartościowa w badaniu pacjentów z FTD, VaD i AD (PETZOLD i współaut. 2007). Najnowsze badania wskazują na NF-L jako potencjalny nieinwazyjny biomarker AD, którego stężenie można oznaczyć we krwi. Stężenie NF-L zawartego w osoczu było większe u pacjentów z MCI (średnio 42,8 ng/l) i z demencją w AD (średnio 51,0 ng/l), w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych bez zaburzeń poznawczych (średnio 34,7 ng/l) ($p < 0.001$). Wykazano ponadto, że NF-L osocza (1) koreluje z NF-L w CSF niezależnie od diagnozy, (2) w przypadku AD posiada dokładność diagnostyczną tego samego rzędu jak ustalone biomarkery CSF i (3) było związane z deficytami poznawczymi i widocznymi w neuroobrazowaniu cechami AD. NF-L osocza, jako obiecujący biomarker uszkodzeń neuronalnych w AD, może mieć znaczenie w rokowaniu i monitorowaniu progresji choroby. Jednak ze względu na wysoki poziom NF-L osocza także i w kilku innych chorobach neurodegeneracyjnych np. FTD, białka te nie mogą służyć jako narzędzie do odróżnienia AD od tych chorób (MATTSSON i współaut. 2017).

PODSUMOWANIE

Badania biomarkerów AD zawartych w mózgu i CSF oraz we krwi, są pomocne w rozróżnianiu także innych rodzajów otępień. Określanie stężeń biomarkerów w CSF przy zastosowaniu testów biomedycznych, w połączeniu z badaniami neuroobrazowymi, pozwala określić stopień degeneracji tkanki nerwowej. Różnice zawartości stężeń uznanych i potencjalnych biomarkerów AD w CSF związanych z aktywacją mikrogleju (sTREM2, Ng), tworzeniem charakterystycznych neurotoksycznych agregatów ($A\beta_{42}$ i t-tau, BACE1), modulacją szlaków wapnio-

wych w komórce (VILIP-1) czy degeneracją synaptyczną (SNAP-25, pro-NGF, GAP-43) i neuronalną (ubikwityna, białka neurofilamentów) ujawniają patologię mózgu wskazując na obecność AD lub prognozując możliwość jej wystąpienia. Dzięki metodom oznaczania biomarkerów możliwe jest dokładniejsze określenie czynników ryzyka i przyczyn zapadalności na tą chorobę. Obecność biomarkerów może w przyszłości ułatwić diagnozowanie choroby, umożliwić określenie stopnia jej zaawansowania i przyczynić się do efektywniejszego poszukiwania odpowiednich leków stabilizujących stan chorych. Ponadto, badania prowadzone nad nowymi biomarkerami znacznie poszerzą wiedzę dotyczącą mechanizmów AD, a badania oparte na modelach zwierzęcych pozwolą być może dokładniej wyjaśnić molekularne podłoże choroby i opracować odpowiednią terapię.

Streszczenie

Choroba Alzheimera (AD) charakteryzuje się postępującymi zaburzeniami poznawczymi, głównie demencją. W celu rozpoznania AD bada się początkowo zawartość biomarkerów choroby czyli specyficznych wskaźników procesów neurodegeneracyjnych obecnych w mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF). Diagnozowanie stanu pacjentów, oprócz oznaczania stężeń biomarkerów wykonywanych metodami immunoenzymatycznymi, opiera się również na technikach neuroobrazowania mózgu i testach genetycznych. W badaniu przyczyn AD cenne są wyniki biotestów prowadzonych na modelach zwierzęcych. Wraz z postępem choroby nasilają się zmiany zwyrodnieniowe w strukturach mózgu, które przejawiają się obecnością blaszek starczych i kłębków neurofibrilarnych, złożonych odpowiednio z β amyloidu i białka tau. Obie substancje są stosowanymi w praktyce klinicznej biomarkerami AD, a ich odpowiednio obniżone lub podwyższone stężenie stwierdza się w CSF. Ważną rolę w patofizjologii AD przypisuje się potencjalnym biomarkerom, takim jak sTREM2, SNAP-25 i BACE1, a także pro-NGF, neurograninie, YKL-40, VILIP-1, GAP-43, ubikwitynie i białkom neurofilamentów.

LITERATURA

- ARMSTRONG R. A., 2009. *The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. Folia Neuropathol. 47, 289-299.
- AVILA J., PALLAS N., BOLÓS M., SAYAS C. L., HERNANDEZ F., 2016. *Intracellular and extracellular microtubule associated protein tau as a therapeutic target in Alzheimer disease and other tauopathies*. Expert Opin. Ther. Targets. 20, 653- 661.
- BARCIKOWSKA-LITWIN M., 1996. Śródtkankowe złogi amyloidowe i zwyrodnienie neurofibrilarne jako podłoże otępienia w chorobie Alzheimera. http://rcin.org.pl/Content/6772/WA697_4738_ZS175_Srodt-zlog-Barcikow_1.pdf
- BARTEN D. M., CADELINA G. W., HOQUE N., DECARR L. B., GUSS V. L., YANG L., SANKARANARAYANAN S., WES P. D., FLYNN M. E., MEREDITH J. E. i współaut., 2011. *Tau transgenic mice as models for cerebrospinal fluid tau biomarkers*. J. Alzheimers Dis. 24, 127-141.

- BARTOSZEWSKA M., 2008. *Molekularne mechanizmy choroby Alzheimera*. Post. Biol. Kom. 35, 333-350.
- BENEDIKZ E., KLOSOWSKA E., WINBLAD B., 2009. *The rat as an animal model of Alzheimer's disease*. J. Cell. Mol. Med. 13, 1034-1042.
- BENOWITZ L. I., PERRONE-BIZZOZERO N. I., FINKLESTEIN S. P., BIRD E. D., 1989. *Localization of the growth-associated phosphoprotein GAP-43 (B-50, F1) in the human cerebral cortex*. J. Neurosci. 9, 990-995.
- BLENNOW K., 2017. *A Review of fluid biomarkers for Alzheimer's Disease: moving from CSF to blood*. Neurol. Therap. 6, 15-24.
- BLENNOW K., DAVIDSSON P., WALLIN A., GOTTFRIES C. G., SVENNERHOLM L., 1994. *Ubiquitin in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and vascular dementia*. Int. Psychogeriatr. 6, 13-22.
- BLENNOW K., DE LEON M. J., ZETTERBERG H., 2006. *Alzheimer's disease*. Lancet 368, 387-403.
- BOGDANOVIC N., DAVIDSSON P., VOLKMAN I., WINBLAD B., BLENNOW K., 2000. *Growth-associated protein GAP-43 in the frontal cortex and in the hippocampus in Alzheimer's disease: an immunohistochemical and quantitative study*. J. Neural. Transm. 107, 463-478.
- BRINKER T., STOPA E., MORRISON J., KLINGE P., 2014. *A new look at cerebrospinal fluid circulation*. Fluids Barriers CNS. 11, 1-16.
- BRINKMALM A., BRINKMALM G., HONER W. G., FRÖLICH L., HAUSNER L., MINTHON L., HANSSON O., WALLIN A., ZETTERBERG H., BLENNOW K. i współaut., 2014. *SNAP-25 is a promising novel cerebrospinal fluid biomarker for synapse degeneration in Alzheimer's disease*. Mol. Neurodegener. 9, 1-13.
- BURGOYNE R. D., MORGAN A., 2015. *Cysteine string protein (CSP) and its role in preventing neurodegeneration*. Semin. Cell. Dev. Biol. 40, 153-159.
- CAVANAUGH S. E., PIPPIN J. J., BARNARD N. D., 2014. *Animal models of Alzheimer disease: historical pitfalls and a path forward*. Altx. 31, 279-302.
- CHENG J., GUOA X. F., ZHANGA T., ZHONG L., BUB G. J., CHEN X. F., 2016. *TREMs in Alzheimer's disease: genetic and clinical investigations*. Clin. Chim. Acta. 463, 88-95.
- CHO S. M., KIM H. V., LEE S., KIM H. Y., KIM W., KIM T. S., KIM D. J., KIM Y., 2014. *Correlations of amyloid- β concentrations between CSF and plasma in acute Alzheimer mouse model*. Sci. Rep. 4, 1-4.
- CHU C. T., CARUSO J. L., CUMMINGS T. J., ERVIN J., ROSENBERG C., HULETTE C. M., 2000. *Ubiquitin immunohistochemistry as a diagnostic aid for community pathologists evaluating patients who have dementia*. Mod. Pathol. 13, 420-426.
- CIECHANOVER A., KWON Y. T., 2015. *Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies*. Exp. Mol. Med. 47, 1-16.
- COUNTS S. E., HE B., PROUT J. G., MICHALSKI B., FAROTTI L., FAHNESTOCK L., MUFSON E. J., 2016. *Cerebrospinal fluid pro-NGF: a putative biomarker for early Alzheimer's Disease*. Curr. Alzheimer Res. 13, 800-808.
- COUNTS S. E., IKOMOVIC M. D., MERCADO N., VEGA I. E., MUFSON E. J., 2017. *Biomarkers for the early detection and progression of Alzheimer's Disease*. Neurotherapeutics. 14, 35-53.
- DE STROOPER B., VASSAR R., GOLDE T., 2010. *The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer Disease*. Nat. Rev. Neurol. 6, 99-107.
- DE VOS A., JACOBS D., STRUYFS H., FRANSEN E., ANDERSSON K., PORTELIUS E., ANDREASSON U., DE SURGELOOSE D., HERNALSTEEN D., SLEEGERS K. i współaut., 2015. *C-terminal neurogranin is increased in cerebrospinal fluid but unchanged in plasma in Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement. 11, 1461-1469.
- DINIZ B., PINTO J.A., FORLENZA O. V., 2008. *Do CSF total tau, phosphorylated tau, and β -amyloid 42 help to predict progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease? A systematic review and meta-analysis of the literature*. World J. Biol. Psychiatry. 9, 172-182.
- FAROOQUI A. A., 2016. *Potential animal models of Alzheimer Disease and their importance in investigating the pathogenesis of Alzheimer Disease*. 132.9783319158884-c1.pdf
- FUNMILAYO E., YEATES A., TESCO G., 2016. *The endosomal-associated deubiquitinating enzyme USP8 regulates BACE1 ubiquitination and degradation*. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M116.718023>
- GALASKO D., 2015. *Expanding the repertoire of biomarkers for Alzheimer's Disease: targeted and non-targeted approaches*. Front. Neurol. 6, 1-13.
- GAWEL M., POTULSKA-CHROMIK A., 2015. *Choroby neurodegeneracyjne: choroba Alzheimera i Parkinsona*. Post. Nauk Med. 28, 468-476.
- GORDON B. A., FRIEDRICHSEN K., BRIER M., BLAZEY T., SU Y., CHRISTENSEN J., ALDEA P., MCCONATHY J., HOLTZMAN D. M., CAIRNS N.J. i współaut., 2016. *The relationship between cerebrospinal fluid markers of Alzheimer pathology and positron emission tomography tau imaging*. Brain. 139, 2249-60.
- GROBLEWSKA M., MUSZYŃSKI P., WOJTULEWSKA-SUPRON A., KULCZYŃSKA-PRZYBIK A., MROCZKO B., 2015. *The role of visinin-like protein-1 in the pathophysiology of Alzheimer's disease*. J. Alzheimers Dis. 47, 17-32.
- GRZYBOWSKA M., KUROWSKA E., LEWANDOWSKA D., 2015. *Biomarkery w chorobie Alzheimera*. <https://www.researchgate.net/publication/295546895>
- HAMPEL H., SHEN Y., 2010. *Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) as a biological candidate marker of Alzheimer's disease*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 69, 8-12.
- HAMPEL H., GOERNITZ A., BUERGER K., 2003. *Advances in the development of biomarkers for Alzheimer's disease: from CSF total tau and $A\beta_{1-42}$ proteins to phosphorylated tau protein*. Brain Res. Bull. 61, 243-253.
- HEAD E., POP V., SARSOZA F., KAYED R., BECKETT T. L., STUDZINSKI C. M., TOMIC J. L., GLABE C. G., MURPHY M. P., 2010. *Amyloid β -peptide and oligomers in the brain and CSF of aged canines*. J. Alzheimers Dis. 20, 637-646.
- HELLWIG K., KVARTSBERG H., PORTELIUS E., ANDREASSON U., OBERSTEIN T. J., LEWCZUK P., BLENNOW K., KORNUBER J., MALER J.M., ZETTERBERG H. i współaut., 2015. *Neurogranin and YKL-40: independent markers of synaptic degeneration and neuroinflammation in Alzheimer's disease*. Alzheimers Res. Ther. 7, 1-8.
- HELSEGRAVE A., HEYWOOD W., PATERSON R., MAGDALINO N., SVENSSON J., JOHANSSON P., ÖHRFELT A., BLENNOW K., HARDY J., SCHOTT J. i współaut., 2016. *Increased cerebrospinal fluid soluble TREM2 concentration in Alzheimer's disease*. Mol. Neurodegener. 11, 1-7.

- HENJUM K., ALMDAHL I. S., ÅRSKOG V., MINTHON L., HANSSON O., FLADBY T., NILSSON L. N. G., 2016. *Cerebrospinal fluid soluble TREM2 in aging and Alzheimer's disease*. *Alzheimers Res. Ther.* 8, 1-11.
- HONER W. G., BARR A. M., SAWADA K., THORTHON A. E., MORRIS M. C., LEURGANS S. E., SCHNEIDER J. A., BENNETT D. A., 2012. *Cognitive reserve, presynaptic proteins and dementia in the elderly*. *Transl. Psychiatry* 2, 1-8.
- HONG L., HUANG H. C., JIANG Z. F., 2014. *Relationship between amyloid-beta and the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease*. *Neurol. Res.* 36, 276-282.
- HU W. T., CHEN-PLOTKIN A., ARNOLD S. E., GROSSMAN M., CLARK C. M., SHAW L. M., MCCLUSKEY L., ELMAN L., KARLAWISH J., HURTIG H. I. i współaut., 2010. *Biomarker discovery for Alzheimer's Disease, frontotemporal lobar degeneration, and Parkinson's Disease*. *Acta Neuropathol.* 120, 385-399.
- HU Y. Y., HE S. S., WANG X. C., DUAN Q. H., KHATOON S., IQBAL K., GRUNDKE-IQBAL I., WANG J. Z., 2002. *Elevated levels of phosphorylated neurofilament proteins in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients*. *Neurosci. Lett.* 320, 156-160.
- JOHANSON C. E., DUNCAN J. A., KLINGE P. M., BRINKER T., STOPA E. G., SILVERBERG G. D., 2008. *Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease*. *Cerebrospinal Fluid Res.* 5, 1-32.
- JÓZWIAK A., 2008. *Otępienie u osób w wieku starszym*. *Geriatria* 2, 237-246.
- JUNTILA A., 2015. *Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in the differential diagnosis of neurodegenerative diseases*. http://epublications.uef.fi/pub/urn_isbn_978-952-61-1942-7/urn_isbn_978-952-61-1942-7.pdf
- KANDIMALLA R. J., ANAND R., VEERAMANIKANDAN R., WANI W. Y., PRABHAKAR S., GROVER V. K., BHARADWAJ N., JAIN K., GILL K. D., 2014. *CSF ubiquitin as a specific biomarker in Alzheimer's disease*. *Curr. Alzheimer. Res.* 11, 340-348.
- KHAN S. S., BLOOM G. S., 2016. *Tau: the center of a signaling nexus in Alzheimer's disease*. *Front. Neurosci.* 10, 1-5.
- KIRKWOOD C. M., MACDONALD M. L., SCHEMPF T. A., VATSAVAYI A. V., IKONOMOVIC M. D., KOPPEL J. L., DING Y., SUN M., KOFLER J. K., LOPEZ O. L. i współaut., 2016. *Altered levels of Visinin-Like Protein 1 correspond to regional neuronal loss in Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration*. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 75, 175-82.
- KNAPSKOG A. B., ENGEDAL K., BRAEKHUS A., 2016. *Performance of cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer Disease in a memory clinic in Norway*. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 30, 8-14.
- KUMAR A., AGGARWAL A., SINGH A., NAIDU P. S., 2016. *Animal models in drug discovery of Alzheimer's disease: a mini review*. *EC Pharmacol. Toxicol.* 2, 60-79.
- LA FERLA F. M., GREEN K. N., 2012. *Animal models of Alzheimer disease*. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, 1-13.
- LANARI A., PARNETTI L., 2009. *Cerebrospinal fluid biomarkers and prediction of conversion in patients with mild cognitive impairment: 4-year follow-up in a routine clinical setting*. *Sci. World J.* 9, 961-966.
- LECKER S. H., GOLDBERG A. L., MITCH W. E., 2006. *Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states*. *J. American Soc. Nephrol.* 17, 1807-1819.
- LUO X., HOU L., SHI H., ZHONG X., ZHANG Y., ZHENG D., TAN Y., HU G., MU N., CHAN J. i współaut., 2013. *CSF levels of the neuronal injury biomarker visinin-like protein-1 in Alzheimer Disease and Dementia with Lewy bodies*. *J. Neurochem.* 127, 681-690.
- MAIA L. F., KAESER S. A., REICHWALD J., LAMBERT M., OBERMÜLLER U., SCHELLE J., ORDENTHAL J., MARTUS P., STAUFENBIEL M., JUCKER M., 2015. *Increased CSF A β during the very early phase of cerebral A β deposition in mouse models*. *EMBO Mol. Med.* 7, 895-903.
- MARSZALEK M., 2016. *Choroba Alzheimera a produkty degradacji białka APP. Formowanie i różnorodność form fibrylujących peptydów – wybrane aspekty*. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 70, 787-796.
- MATTSSON N., INSEL P. S., PALMQWIST S., PORTELIUS E., ZETTERBERG H., WEINER M., BLENNOW K., HANSSON O., 2016. *Cerebrospinal fluid tau, neurogranin, and neurofilament light in Alzheimer's disease*. *EMBO Mol. Med.* 8, 1184-1196.
- MATTSSON N., ANDREASSON U., ZETTERBERG H., BLENNOW K., WEINER M., AISEN P., TOGA A., PETERSEN R., JACK C., JAGUST W., i współaut., 2017. *Association of plasma neurofilament light with neurodegeneration in patients with Alzheimer disease*. *JAMA Neurol.* 74, 557-566.
- MEHRABIAN S., ALEXOPOULOS P., ORTNER M., TRAYKOW L., GRIMMER T., KURZ A., FÖRTZL H., BICKEL H., DIEHL-SCHMID J., 2015. *Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: the role of apolipoprotein E genotype, age, and sex*. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 11, 3105-10.
- MENÉNDEZ-GONZÁLEZ M., 2014. *Routine lumbar puncture for the early diagnosis of Alzheimer's disease. Is it safe?* *Front. Aging Neurosci.* 6, 1-2.
- MULDER S. D., VAN DER FLIER W. M., VERHELJEN J. H., MULDER C., SCHELTENS P., BLANKENSTEIN M. A., HACK C. E., VEERHUIS R., 2010. *BACE1 activity in cerebrospinal fluid and its relation to markers of AD pathology*. *J. Alzheimers Dis.* 20, 253-260.
- NAZEM A., SANKOWSKI R., BACHER M., AL-ABED Y., 2015. *Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease*. *J. Neuroinflammation.* 12, 1-15.
- NERY L. R., ELTZ N. S., HACKMAN C., FONSECA R., ALTENHOFEN S., GUERRA H. N., FEITAS V. M., BONAN C. D., RYFF MOREIRA M., VIANNA R., 2014. *Brain intraventricular injection of amyloid-b in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium*. *PLOS One* 9, 1-9.
- OKONKWO O. C., ALOSCO M. L., GRIFFITH H. R., MIELKE M. M., SHAW M. L., TROJANOWSKI J. Q., TREMONT G., 2010. *Cerebrospinal fluid abnormalities and rate of decline in everyday function across the dementia spectrum: normal aging, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*. *Arch. Neurol.* 67, 688-696.
- OLSSON B., LAUTNER R., ANDREASSON U., ÖHRFELT A., PORTELIUS E., BJERKE M., HÖLTÄ M., ROSEN C., OLSSON C., STROBEL G. i współaut., 2016. *CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis*. *Lancet. Neurol.* 15, 673-684.
- PAPALIAGKAS V. T., 2013. *The role of cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease dia-*

- gnosis. *Where are we now? Recent Pat. CNS Drug Discov.* 8, 70-78.
- PERRY G., FRIEDMAN R., SHAW G., CHAU V., 1987. *Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3033-3036.
- PETZOLD A., KEIR G., WARREN J., FOX N., ROSSOR M. N., 2007. *A systematic review and meta-analysis of CSF neurofilament protein levels as biomarkers in dementia.* Neurodegener. Dis. 4, 185-194.
- PICCIO L., DEMING Y., DEL AGUILA J. L., GHEZZI L., HOLTZMAN D. M., FAGAN A. M., FENGOLIO C., GALIMBERTI D., BORRONI B., CRUCHAGA C., 2016. *Cerebrospinal fluid soluble TREM2 is higher in Alzheimer disease and associated with mutation status.* Acta. Neuropathol. 131, 925-933.
- PORTELIUS E., ZETTERBERG H., SKILLBÄCK T., TÖRNQUIST U., ANDREASSON U., TROJANOWSKI J. Q., WEINER M. W., SHAW L. M., MATTSON N., BLENNOW K., 2015. *Cerebrospinal fluid neurogranin: relation to cognition and neurodegeneration in Alzheimer's disease.* Brain. 138, 3373-3385.
- PRÜßING K., VOIGHT A., SCHULTZ J. B., 2013. *Drosophila melanogaster as a model organism for Alzheimer's disease.* Mol. Neurodegener. 8, 1-12.
- RASKIN J., CUMMINGS J., HARDY J., SCHUH K., DEAN R. A., 2015. *Neurobiology of Alzheimer's disease: integrated molecular, physiological, anatomical, biomarker and cognitive dimensions.* Curr. Alzheimer Res. 12, 712-722.
- REMNESTÅL J., JUST D., MITSIONS N., FREDOLINI C., MULDER J., SCHWENK J. M., UHLÉN M., KULTIMA K., INGELSOON M., KILANDER L. i współaut., 2016. *CSF profiling of the human brain enriched proteome reveals associations of neuromodulin and neurogranin to Alzheimer's disease.* Proteomics. Clin. Appl. 10, 1242-1253.
- RITTER A., CUMMINGS J., 2015. *Fluid biomarkers in clinical trials of Alzheimer's disease therapeutics.* Front. Neurol. 6, 1-17.
- SABBAGH J. J., KINNEY J. W., CUMMINGS J. L., 2013. *Alzheimer's disease biomarkers: correspondence between human studies and animal models.* Neurobiol. Dis. 56, 116-130.
- SALARI S., BAGHERI M., 2016. *A review of animal models of Alzheimer's disease: a brief insight into pharmacologic and genetic models.* Physiol. Pharmacol. 20, 5-11.
- SANKARANARAYANAN S., BARTEN D. M., VANA L., DEVIDZE N., YANG L., CADELINA G., HOQUE N., DECARR L., KEENAN S., LIN A. i współaut., 2015. *Passive immunization with phospho-tau antibodies reduces tau pathology and functional deficits in two distinct mouse tauopathy models.* PLoS One 1,1-28.
- SANTOS VIDEIRA R.M., 2013. *Cerebrospinal fluid biomarkers for neurodegenerative disorders.* <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/25736/1/Tese%20Mestrado%20Rita%20Margarida%20Videira.pdf>
- SASAGURI H., NILSSON P., HASHIMOTO S., NAGATA K., SAITO T., DE STROOPER B., HARDY J., VASSAR R., WINBALD B., SAIDO T. C., 2017. *APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies.* EMBO J. 36, 2473-2487.
- SCHELTENS P., BLENNOW K., BRETELER M. M. B., DE STROOPER B., FRISONI G. B., SALLOWAY S., VAN DER FLIER V. M., 2016. *Alzheimer's disease.* Lancet 388, 505-517.
- SCHINDLER S. E., HOLTZMAN D. M., 2016. *CSF sTREM2: marking the tipping point between preclinical AD and dementia?* EMBO Mol. Med. 8, 1-2.
- SCHMAND B. A., EIKELEENBOOM P., VAN GOOL V. A., RICHARD E., 2013. *MRI and cerebrospinal fluid biomarkers for predicting progression to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a diagnostic accuracy study.* BMJ Open 3, 1-9.
- SIMON M. J., ILIFF J. J., 2016. *Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease.* Biochim. Biophys. Acta. 1862, 442-451.
- SINCLAIR L. I., TAYLER H. M., LOVE S., 2015. *Synaptic protein levels altered in vascular dementia.* Neuropathol. Appl. Neurobiol. 41, 533-543.
- SJÖGREN M., MINTHON L., DAVIDSSON P., GRANÉRUS A. K., CLARBERG A., VANDERSTICHELE H., VANMECHLEN E., WALLIN A., BLENNOW K., 2000. *CSF levels of tau, β -amyloid1-42 and GAP-43 in frontotemporal dementia, other types of dementia and normal aging.* J. Neural. Transm. 107, 563-579.
- SJÖGREN M., DAVIDSSON P., GOTTFRIES J., VANDERSTICHELE H., EDMAN A., VANMECHLEN E., WALLIN A., BLENNOW K., 2001. *The cerebrospinal fluid levels of tau, growth-associated protein-43 and soluble amyloid precursor protein correlate in Alzheimer's disease, reflecting a common pathophysiological process.* Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 12, 257-264.
- SKILLBÄCK T., FARAHMAND B. Y., ROSÉN C., MATTSSON N., NÄGGA K., KILANDER L., RELIGA D., WIMO A., WINBLAD B., SCHOOT J. M. i współaut., 2015. *Cerebrospinal fluid tau and amyloid- β 1-42 in patients with dementia.* Brain. 138, 2716-2731.
- SNYDER H. M., CARRILLO M. C., GRODSTEIN F., HENRIKSEN K., JEROMIN A., LOVESTONE S., MIELKE M., O'BRYANT S., SARSA M., SJÖRGEN M. i współaut., 2014. *Developing novel blood-based biomarkers for Alzheimer's disease.* Alzheimers Dement. 1, 109-114.
- SUÁREZ-CALVET M., KLEINBERGER G., CABALLERO M. A. A., BRENDEL M., ROMINGER A., ALCOLEA D., FORTEA J., LLEÓ A., BLES A., GISPERT J. D. i współaut., 2016. *sTREM2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage Alzheimer's disease and associate with neuronal injury markers.* EMBO Mol. Med. 8, 466-476.
- SWEENEY M. D., SAGARE A. P., ZLOKOVIC B. V., 2015. *Cerebrospinal fluid biomarkers of neurovascular dysfunction in mild dementia and Alzheimer's disease.* J. Cereb. Blood Flow Metab. 35, 1055-1068.
- THORSELL A., BJERKE M., GOBOM J., BRUNHAGE E., VANMECHELEN E., ANDREASEN N., HANSSON O., MINTHON L., ZETTERBERG H., BLENNOW K., 2010. *Neurogranin in cerebrospinal fluid as a marker of synaptic degeneration in Alzheimer's disease.* Brain Res. 1362, 13-22.
- TOLEDO J. B., BRETTSCHEIDER J., GROSSMAN M., ARNOLD S. E., HU W. T., XIE S. X., LEE V., SHAW L. M., TROJANOWSKI J. Q., 2012. *CSF biomarkers cutoffs: the importance of coincident neuropathological diseases.* Acta Neuropathol. 124, 23-35.
- ULRICH J. D., HOLTZMAN D. M., 2016. *TREM2 function in Alzheimer's Disease and neurodegeneration.* ACS Chem. Neurosc. 7, 420-427.
- VANDERSTICHELE H., TROJANOWSKI J. Q., SHAW L. M., KANG J., 2012. *Simultaneous analysis of cerebrospinal fluid biomarkers using microsphere-based xMAP multiplex technology for*

- early detection of Alzheimer's disease. *Methods* 56, 484-493.
- VILLEGAS-LLERENA C., PHILLIPS A., GARCIA-REITBOECK P., HARDY J., POCOCK J. M., 2016. *Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 36, 74-81.
- WANG L., LEUNG Y. Y., CHANG S., LEIGHT S., KNAPIK-CZAJKA M., SHAW L. M., LEE V., TROJANOWSKI J. Q., CLARK C. M., 2012. *Comparison of xMAP and ELISA assays for detecting CSF biomarkers of Alzheimer's Disease*. *J. Alzheimers Dis.* 31, 439-445.
- WELLINGTON H., PATERSON R. W., PORTELIUS E., TÖRNQVIST U., MAGDALINO N. i współaut., 2016. *Increased CSF neurogranin concentration is specific to Alzheimer disease*. *Neurology* 86, 829-35.
- WOJDA U., KUZNICKI J., 2013. *Alzheimer's disease modeling: ups, downs, and perspectives for human induced pluripotent stem cells*. *J. Alzheimers Dis.* 34, 563-588.
- XU J., LUO F., ZHANG Z., XUE L., WU X., CHIANG H., SHIN W., WU L., 2013. *SNARE proteins synaptobrevin, SNAP-25 and syntaxin are involved in rapid and slow endocytosis at synapses*. *Cell Re.* 3, 1414-1421.
- ZBOCH M., LESZEK J., 2010. *Znaczenie biologicznych markerów we wczesnej diagnostyce choroby Alzheimerera*. *Psychogeriatrya Polska.* 7, 29-37.
- ZETTERBERG H., 2017. *Applying fluid biomarkers to Alzheimer disease*. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* w druku, doi: 10.1152/ajpcell.00007.2017.
- ZETTERBERG H., WILSON D., ANDREASSON U., MILTHON L., BLENNOW K., RANDALL J., HANSSON O., 2013. *Plasma tau levels in Alzheimer's disease*. *Alzheimers Res. Ther.* 9, 1-3.

KOSMOS Vol. 67, 4, 863-874, 2018

MAGDALENA GARTYCH, DOROTA BUKOWSKA

*Department of Neurobiology, Poznan University of Physical Education, 27/39 Królowej Jadwigi Str., 61-871 Poznań,
E-mail: gartych@awf.poznan.pl, bukowska@awf.poznan.pl*

BIOMARKERS OF CEREBROSPINAL FLUID IN ALZHEIMER DISEASE

Summary

Alzheimer disease (AD) is characterized by a progressive cognitive disorders. In order to diagnose AD, at first a content of biomarkers of neurodegenerative processes in brain and cerebrospinal fluid (CSF) is examined. It is based on the determination of changes in concentration of biomarkers using immunoenzymatic assays, neuroimaging and genetic tests. Biotests carried out on animal models are valuable for determining causes of AD. With progress of AD degenerative changes in brain structures become more pronounced. They manifest itself as senile plaques and neurofibrillary tangles, containing β amyloid and tau protein, respectively. Both substances are biomarkers used in clinical practice to assess the disease progression as their decreased or elevated concentration can be detected in CSF. Additionally, important role in the pathophysiology of AD is assigned to potential biomarkers, such as sTREM2, SNAP-25 and BACE1, and pro-NGF, neurogranin, YKL-40, VILIP-1, GAP-43, ubiquitin and neurofilaments proteins.

Keywords: Alzheimer disease, biomarkers, cerebrospinal fluid