

Received: 2015.04.06
Accepted: 2016.11.18
Published: 2017.05.17

Choroba Alzheimer'a a produkty degradacji białka APP. Biologia, patobiologia i fizykochemia fibrylujących peptydów – wybrane aspekty

Alzheimer's disease against peptides products of enzymatic cleavage APP protein: Biological, pathobiological and physico-chemical properties of fibrillating peptides

Małgorzata Marszałek

Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, rencistka

Streszczenie

Peptydowe produkty degradacji podstawowego dla patofizjologii choroby Alzheimer'a (Alzheimer's disease, AD) białka APP (Amyloid Precursor Protein, APP), choć dobrze już poznano, jednak nadal budzą zainteresowanie i są przedmiotem intensywnych, wszechstronnych badań. Zainteresowanie budzą zwłaszcza nowo odkrywane liczne, amyloidogenne formy peptydów A β . W pracy omówiono problematykę formowania, biodystrybucji, transportu, translokacji oraz usuwania z różnych przestrzeni płynów mózgu, takich jak płyn wewnątrzkomórkowy (Intracellular Fluid, ICF), płyn mózgowo-rdzeniowy (Cerebrospinal Fluid, CSF), płyn śródmiąższowy (Interstitial Fluid, ISF), surowica czy mocz, tych fizjologicznie istotnych peptydów. Omówiono też m.in. mechanizmy translokacji przez barierę krew-mózg (Blood-Brain - Barrier, BBB) i pokonywania bariery krew-płyn mózgowo-rdzeniowy (Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier, BCSFB) oraz zarysowano nową koncepcję mechanizmu usuwania fibrylujących peptydów w oparciu o aktywność tzw. układu glimfatycznego mózgu. Poruszono problemy diagnostyczne, które mają źródło w naturze fizyko-chemicznej samych białek czy fibrylujących peptydów, jak np: niskie ich stężenie w płynach ciała, krótki czas życia, bądź które wynikają z problemów techniczno-eksperymentalnych jak np.: wysoka adsorpcja czy niska rozpuszczalność A β , tau czy amyliny. Przedstawiono problematykę biomarkerów i parametrów diagnostycznych, które mogą coraz lepiej odzwierciedlać wstępne etapy rozwijającej się choroby lub monitorować jej rozwój jak np.: iloraz stężeń form A β 1-42 i A β 1-40 w płynach ciała (A β 42/A β 40) lub iloraz ten w kombinacji z całkowitym stężeniem białka tau, a także inne nowe markery: peptydy A β 1-38, białka stresu oksydacyjnego, peptydy towarzyszące procesom zapalnym, czynnik komplementu H (complement factor H), alfa-2 makroglobuliny (alpha-2-macroglobulin) czy klusteryny (clusterin). Opisano różne formy patologicznych depozytów amyloidowych odnajdywanych w swoistych regionach mózgu chorych na AD, omówiono ich skład i dokonano analizy pod kątem ich znaczenia w rozwoju AD. Analizie poddano „fibrylujące peptydy” i ich formy monomeryczne, które w warunkach patologicznych potrafią „wymknąć” się spod prawidłowych mechanizmów kontrolnych komórki i w fizykochemicznie zmienionej postaci uczestniczyć w rozwoju choroby, w tym przypadku choroby AD. W pracy zarysowano też liczne wątpliwości i postawiono liczne pytania dotyczące omówionych zagadnień.

Słowa kluczowe: choroba Alzheimer'a • białko prekursorowe amyloidu • APP • peptyd A β • proces fibrylacji • amyloid



Summary

Various peptides products of enzymatic cleavage of key for Alzheimer's disease Amyloid Precursor Protein (APP) are well known, but still are matter of scientific debate.

The A β type products are especially challenging for experimental and medical research.

This paper outlines several, still poorly known, biological and medical processes such as peptides biology, i.e., formation, biodistribution, translocation, transport and finally removal from brain compartments and body fluids like Intracellular Fluid (ICF), Cerebrospinal Fluid (CSF), Interstitial Fluid (ISF), blood serum or urine.

In addition, the following studies concerning AD patients might prove challenging and simultaneously promising: peptides translocation through Blood-Brain – Barrier (BBB) and Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier (BCSFB) and their removal from the brain according to a new concept of glymphatic system; – diagnostic difficulties that stem from physico-chemical properties and the nature of proteins or fibrillating peptides itself like low concentration, short half-live and from experimental-technical problems as well like high adsorption or low solubility of A β , tau or amylin.

The study of diagnostic parameters is very important, as it may better reflect early changes before the disease develops; one such parameter is the A β 42/A β 40 ratio, or the ratio with the total tau concentration combination and other new biomarkers like A β 1-38; other factors include oxidative stress and inflammation process proteins, complement factor H, alpha-2-macroglobulin, or clusterin.

The study of various forms of pathological amyloid deposits that emerge in different but specific brain regions AD patients seems to be crucial as well.

The composition of the first initial pathological, pre-fibrillating monomers of fibrillating peptides and their role in AD development and disease progression have been described as well. They are even more challenging for science and simultaneously might be more promising in early diagnosis for AD patients. As always in science, research leads to endless discoveries and further inquiry. Fundamental problems in this field most probably are still far from being definitively comprehended, and multiple crucial questions await better answers. What we really need is to study more and deeper into this matter.

Keywords: Alzheimer's disease • Amyloid Precursor Protein • APP • A β peptide • fibrillation process • amyloid

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1238137>

Word count: 6082

Tables: –

Figures: –

References: 64

Adres autorki: dr Małgorzata Marszałek, rencistka, Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 143, Łódź; e-mail: mtmarsz@wp.pl

Wykaz skrótów: A β – β -amyloid, produkty degradacji polipeptydu APP, A β _T – sekwencja aminokwasowa całkowitego fibrylującego fragmentu białka APP (A β total), A β 1-42 – 42 aminokwasowy peptyd typu A β , A β 1-40 – 40 aminokwasowy peptyd typu A β , ACTF – pozamembranowy peptyd APP, AD – choroba Alzheimera, ADAM – metaloproteinazy cynkowe, ADDLs – oligomery peptydu A β , AGEs – końcowe produkty wzmożonej glikacji, AICD – cytoplazmatyczny, wewnątrzkomórkowy odcinek białka APP, APP – białko prekursorowe amyloidu, sAPP α i sAPP β – rozpuszczalne N-końcowe produkty trawienia APP, APLP1 i APLP2 – białka podobne do białka APP, APPL i APL-1 – homologi białka APP, BACE – sekretaza β , BCSFB – bariera krew-płyn mózgowo-rdzeniowy, BBB – bariera krew-mózg, CSF – płyn mózgowo-rdzeniowy, CTF – C-końcowe fragmenty APP, C99 – 99 aminokwasowy peptyd α CTF, C83 – 83-amino-kwasowy peptyd α CTF, DM2 – cukrzyca typu 2, FAD – rodzinna postać AD, ISF – płyn śródmiąższowy, LRP-1 – białko transportujące lipidy, NEP – neprylizyna, OUN – ośrodkowy układ nerwowy, PAVS – przestrzeń pozanaczyniowa, Pgp – glikoproteina P, PS – preseniliny, RAGE – receptor końcowych produktów zaawansowanej glikacji, SAD – sporadyczna postać AD, ThS – tioflawina S, TJs – ścisłe połączenia komórkowe, VC – kompartment naczyniowy mózgu, VSMC – komórki mięśni gładkich naczyń.

WSTĘP

Przyjmuje się, że peptydowe produkty trawienia białka APP (Amyloid Precursor Protein, APP), tj. fibrylujące peptydy typu A β , są nierozzerwalnie związane z rozwojem choroby Alzheimera (AD). W tej grupie ważny wydaje się peptyd A β 1-42, który występuje u chorych na AD w dwóch postaciach. Pierwsza – to forma rozpuszczalnego peptydu, który jest obecny w płynach ciała, takich jak: płyn wewnątrzkomórkowy (Intracellular Fluid, ICF), płyn mózgowo-rdzeniowy (Cerebrospinal Fluid, CSF), płyn śródmiąższowy (Interstitial Fluid, ISF), surowica czy moczu. Analiza jego stężeń w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na AD pozwala wpisać go na listę biomarkerów tej choroby. Druga forma to fibryle. Ich obecność w depozytach amyloidowych w postaci plak starczych, odnajdywanych w mózgach chorych, badanych *post mortem*, przyjęto traktować jako cechę patognomiczną choroby, choć w rzeczywistości zmiany towarzyszą także innym chorobom neurodegeneracyjnym [4,31].

Obecnie przyjmuje się, że peptyd A β 1-42 w formie fibryli jednak w ogóle nie odpowiada za rozwój choroby AD. Wiadomo też, że formowane fibryle nie są czynnikiem wywołującym i przyczyniającym się do rozwoju i postępu tego i innych schorzeń, w tym chorób neurodegeneracyjnych czy cukrzycy typu 2 (Diabetes Mellitus type 2, DM2). To pierwsze formy fizykochemicznie zmienionego peptydu, powstające na szlaku fibrylotwórczym i formy nieco większe, bo konglomeratów cząstek monomeru peptydu, ale jeszcze nie fibryle, są neurotoksyczne i odpowiadają za liczne, różne uszkodzenia komórek, prowadzące do ich śmierci [37,41].

Mechanizmy biodystrybucji formowanych peptydów w obrębie mózgu, mechanizmy ich translokacji, m.in. przez barierę krew-mózg (Blood-Brain - Barrier, BBB) i ostatecznie ich usuwania z tego narządu i z organizmu są przedmiotem badań. Niedawno zaproponowano nowy model usuwania takich fibrylujących peptydów, opierając się na mechanizmach funkcjonowania tzw. układu limfatycznego w mózgu. Jego dysfunkcja może prowadzić do zaburzenia usuwania peptydów i odpowiadać za nadmierne ich gromadzenie w różnych strukturach mózgu, co w konsekwencji składa się na obraz choroby [25].

W pracy zaprezentowano problematykę formowania, biodystrybucji, usuwania z różnych przestrzeni i płynów mózgu peptydowych produktów trawienia białka APP, w tym fizjologicznie istotnych peptydów, np. typu A β . To one, w warunkach patologicznych, potrafią jednak „wymknąć” się spod prawidłowych mechanizmów kontrolnych komórki i w fizykochemicznie zmienionej formie uczestniczyć w rozwoju choroby, w tym przypadku choroby AD.

TRANSLOKACJA I WYMIANA PEPTYDÓW A β W PŁYNACH MÓZGU

W wyniku degradacji prekursorowego białka APP przez różne typy sekretaz powstają różnorodne peptydy, w tym

m.in. peptydy A β . Wiadomo, że peptydy te powstają nie tylko na zewnątrz komórki neuronalnej, ale też i w obrębie komórki, tj. wewnątrzkomórkowo. Wszystkie peptydy powstające w wyniku degradacji peptydu A β _T (A β total), tj., sekwencji aminokwasowej całkowitego fibrylującego fragmentu białka APP, mogą się znaleźć w ISF, CSF w surowicy krwi czy w moczu [21,59,64].

Pula różnorodnych produktów degradacji białka APP, w tym i peptydów A β , trafia do tzw. przestrzeni pozanaczyniowej (Paravascular Space, PAVS), czyli obszaru mózgu, wypełnionego zewnątrzkomórkowym płynem śródmiąższowym ISF, który stanowi jeden z kilku kompartmentów wodnych mózgu. Obszar pozanaczyniowy to przestrzeń, którą wykreślają dwie funkcjonujące w mózgu bariery: bariera utworzona z komórek śródbłonna i bariera utworzona przez komórki glejowe. Powstaje on na styku komórek mózgu i krwi, a tworzą go: sieć kanałów okołonaczyniowych (perivascular channels), czyli przestrzeń okołonaczyniowa (Perivascular Space, PEVS), która towarzyszy naczyniom krwionośnym o nieco większej średnicy i jest umiejscowiona wzdłuż tych naczyń, oplatając naczynia zarówno tętnicze, jak i żyłne, a także obszar lokujący się między tymi naczyniami, czyli obszar parenchymy mózgu, wypełniony różnymi typami komórek mózgowych, w tym i astrocytami. Sieć ta, niejako „towarzysząca” gęstej sieci kapilarnych naczyń krwionośnych w mózgu, stanowi element przewodzący i obszar wymiany płynów nowo opisanego tzw. układu limfatycznego mózgu [25,28].

Wysoce wyspecjalizowane struktury błonowe oddzielają od siebie cztery kompartmenty wodne mózgu, którymi są płyny: ICF, ISF, CSF i krew w kompartmentcie naczyniowym (Vascular Compartment, VC). Stanowią one: ICF – 68%, ISF – 12%, CSF – 10%, a VC około 10% płynów mózgu [57,62]. Skład płynu ICF zależy od typu komórki, w której występuje i od budowy błony komórkowej, która stanowi barierę oddzielającą wewnątrz komórki od jej środowiska, a zdeterminowany jest aktywnością pompy sodowo-potasowej (Na⁺-K⁺-ATPase) [56,57].

Natomiast płyn ISF jest jedną z postaci płynu zewnątrzkomórkowego organizmu (Extracellular Fluid, ECF) i stanowi w mózgu około 2,5% płynu ECF. Płyn ISF jest swego rodzaju łącznikiem między ICF a obszarem wewnątrznaczyniowym. Wypełnia także puste przestrzenie wszystkich tkanek ciała, w tym przestrzenie w tkance nerwowej oraz w tkance mięśniowej. Powstaje na skutek aktywności metabolicznej tkanek i jako przesącz krwi. W obrębie ośrodkowego układu nerwowego ISF w mózgu stanowi ekwiwalent ISF w innych narządach i tkankach. Jednak w mózgu, istniejąca w pewnych jego obszarach bariera krew-mózg, w tym przypadku bariera krew-ISF, pełni funkcje kontrolne w sposób szczególny, niespotykany w innych narządach. Inne narządy, poza ośrodkowym układem nerwowym (Central Nervous System, CNS) i okiem, choć zawierają ISF, to jednak nie mają ekwiwalentu płynu CSF mózgu, a ich drenaż limfatyczny różni się znacząco od drenażu limfatycznego ISF z CNS. W ludzkim mózgu jest wytwarzany w tempie około 0,11-



0,29 ml/minutę/g mózgu, a całkowitą jego objętość szacuje się na około 280 ml [62,63].

Płyn CSF jest to pozakomórkowy wodny roztwór jonów, substancji odżywczych, substancji neuroreaktywnych i neurotransmiterów, a także substancji regulatorowych i szkodliwych substancji metabolicznych usuwanych z mózgu [50,61]. W odróżnieniu od układu krwionośnego, który jest otwarty i funkcjonuje w całym ciele, układ przenoszący płyn CSF jest ograniczony, gdyż wypełnia przestrzeń: podpajęczynówkową, kanał śródkomorowy rdzenia kręgowego i układ komorowy mózgu [61].

Płyn CSF jest formowany dwuetapowo: najpierw jako przesącz komórek śródbłonna naczyń spłotu, a następnie w drugim etapie jest wydzielany aktywnie, gdyż jest produktem sekrecji głównie komórek nabłonkowych spłotu naczyńiówkowego, a także komórek wyściółki. Około 75-80% wydzielanego CSF powstaje w obrębie pajęczynówki w spłotach naczyńiówki w wyniku filtracji i wydzielania, a około 20-25% płynu jest pochodzenia pozanaczyńiówkowego.

Komórki nabłonkowe naczyńiówki są wysoce spolaryzowane. Ze względu na pełnione funkcje transportowe błony komórkowe obydwu końców komórki, tj. końca apikalnego i bazolateralnego, mają niezwykle rozwiniętą powierzchnię. W miejscach apikalnych połączeń komórek znajdują się ściśle połączenia komórkowe (TJs), które uniemożliwiają swobodny przepływ substancji przez błonę komórki, tworząc barierę, tj. barierę krew-CSF (Blood–Cerebrospinal Fluid barrier, BCSFB). Powstaje ona wskutek obecności TJs na apikalnym końcu komórek nabłonkowych spłotu naczyńiówkowego, a nie z powodu obecności warstwy śródbłonna naczyń kapilarnych rzęsek, jak w przypadku BBB [5,14,49].

Bariera krew-mózg jest systemem niewystarczającym i dlatego też nie jest jedyną barierą funkcjonującą w mózgu. Drugą, zewnętrzną wobec ścian naczyń krwionośnych, barierę tworzą zatem komórki glejowe, tj. astrocyty. Wydaje się, że w wytwarzaniu płynu ISF i wymianie jego składników w mózgu aktywnie uczestniczy kompleks astrocytarno-naczyńiowy. Tempo wytwarzania ISF w mózgu wyznaczono na podstawie analizy tempa usuwania znaczników podanych do parenchymy mózgu. Sądzi się, że jest ono 100-krotnie niższe od tempa wytrawiania CSF [5,25].

To właśnie w przestrzeni PAVS mózgu może nastąpić dwukierunkowy proces wymiany składników płynu ISF i płynu CSF. Wymianie podlegają także obecne w ISF peptydy A β . Na tym etapie mogą ulegać degradacji za pośrednictwem komórek mięśni gładkich naczyń (vascular smooth muscle cells, VSMC), perycytów czy astrocytów, a także wewnątrz – i zewnątrzkomórkowej degradacji neuronalnej. Peptydy A β są usuwane z mózgowego ISF jako formy rozpuszczalne, a także dzięki aktywności systemu białek chaperonowych w ISF, np. apolipoproteiny E (apoE), apolipoproteiny J czy α 2-macroglobuliny, które współdziałają w transporcie

A β . Rolę odgrywają także komórki mikrogleju i makrofagi okołonaczyniowe [2].

W mózgu człowieka transport A β może następować bezpośrednio do krwiobiegu, wydaje się, że jest to sposób dominujący, ale peptydy te mogą też być przenoszone drogą okołonaczyniową (perivascularną). Sugeruje się, że siłą napędową są w tym przypadku pulsacje mózgowych naczyń krwionośnych, a każda forma ich dysfunkcji zaburza proces usuwania peptydów i sprzyja ich odkładaniu się w ścianach naczyń krwionośnych, co zaobserwowano w przebiegu AD [2].

Inną możliwą drogą transportu peptydów jest dwukierunkowa wymiana składników płynów ISF i CSF z krwią w kompartmentcie naczyniowym mózgu. W procesie dwukierunkowej wymiany składników płynu ISF i krwi przez barierę BBB rolę odgrywają komórki śródbłonna naczyń kapilarnych, które odpowiadają m.in. za transport peptydów A β do krwi. Natomiast z krwi, przez barierę BBB, peptydy te są transportowane do ISF, m.in. przez receptor RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products, RAGE).

Proces wymiany składników płynu CSF i składników krwi także jest dwukierunkowy. Składniki płynu CSF wędrują do krwi bądź po pokonaniu bariery krew-płyn mózgowo-rdzeniowy (Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier, BCSFB), bądź w wyniku drenażu CSF do krwi lub do naczyń limfatycznych. Z mózgu peptydy A β są transportowane przez BBB dzięki aktywności białka LRP (Lipoprotein Receptor Related Protein-1, LRP-1), które jest związane z powierzchnią komórek naczyń mięśni gładkich. Transport składników z krwi do CSF przez barierę BCSFB odbywa się za pośrednictwem RAGE. Peptydy A β są transportowane z krwi do mózgu przez BBB transcytozę, dzięki aktywności receptorów, z których RAGE jest białkiem podstawowym dla tego transportu. Szybkość transportu jest około 5-6 razy niższa w porównaniu do przenoszenia aminokwasów neutralnych [2,15].

TRANSPORT PEPTYDÓW A β PRZEZ BARIERĘ KREW MÓZG (BBB)

Wysoce wyspecjalizowane komórki śródbłonna (endotelialne) kapilar mózgowych są główną jednostką anatomiczną BBB. Tworzą barierę dyfuzyjną, transportując liczne substancje do i z mózgu. Stanowią też swoisty łącznik między wnętrzem mózgu a jego otoczeniem. Cechą szczególną tych komórek jest ich wysoka polarność z powodu obecności specyficznych połączeń komórkowych typu połączeń ścisłych (tight junctions), ograniczających zjawisko dyfuzji, np. białek i innych związków. Ważną cechą jest też aktywność enzymów degradujących, ponadto ograniczona, zredukowana pinocytoza i obecność selektywnych transporterów wypływu komórkowego (efflux transporters). Ważną rolę w utrzymaniu prawidłowych funkcji BBB pełnią także astrocyty i perycyty. Z endotelialnymi komórkami BBB pozostają również w kontakcie komórki mikrogleju i neuronów.

Wiadomo, że peptydy A β z CSF dość szybko wędrują do krwi, a pokonanie bariery BBB ułatwia białko LRP-1. Obniżone stężenie LRP-1 u chorych na AD wiązano z utrudnionym usuwaniem peptydów A β , ich akumulacją i w konsekwencji z rozwojem choroby. Kolejnym białkiem, którego aktywność wiązano z transportem peptydów A β z komórek śródbłonna do krwi jest glikoproteina Pgp (P-glycoprotein, Pgp). Zaburzenia aktywności tego białka, jako transportera peptydu A β , czy jego dysfunkcję także wiązano z rozwojem AD. Okazało się, że obydwa białka transportowe działają niezależnie od siebie. Do grupy białek, które też wiążą się z transportem peptydów A β należą również: białko prionowe (cellular prion protein) i transportery wielolekowe (multidrug transporters ABC), tj. białka ABCA1, ABCB1 i ABCG2 [15,46].

Zaburzony odpływ i usuwanie peptydów A β z CSF może być jedną z przyczyn zaburzenia homeostazy stężeniowej i wzajemnych proporcji tych peptydów w mózgu. Sugeruje się, że może to skutkować rozwojem choroby AD. Stany patologiczne, takie jak: procesy zapalne, otyłość, DM2 czy wylew krwi do mózgu zaburzają pracę transporterów BBB. Wymienione czynniki są przyczyną szeroko rozumianej dysfunkcji BBB, która także wiąże się z rozwojem AD [15,25,52].

Dysfunkcja BBB polega na uszkodzeniu czy wręcz na zniszczeniu tej struktury, co prowadzi do patologicznych przecieków cyrkulujących w krwiobiegu substancji, w tym substancji neurotoksycznych do przestrzeni mózgowej. Mechanizm dysfunkcji może być różny. Może polegać na zaburzeniu funkcji transporterów, co zaburza dostarczanie i dostępność substancji odżywczych i regulatorowych do i z CSF i do krwi. Może polegać też na aktywacji mediatorów procesu zapalnego w komórkach śródbłonna i stresu oksydacyjnego. Wszystkie wymienione zjawiska: neurotoksyczność, stan zapalny i stres oksydacyjny są obserwowane w obrębie BBB w przebiegu AD. Niezmiernie istotnym czynnikiem zmieniającym i pogarszającym czynność i wydolność BBB są akumulowane w przebiegu AD w obrębie OUN peptydy A β [15].

PEPTYDY A β W SUROWICY KRWI

Krążące we krwi peptydy A β występują w formach związanych z licznymi białkami krwi, np.: albuminą, ApoE czy ApoJ, czy sLRP-1, z czego ta ostatnia, rozpuszczalna forma LRP-1, wiąże najwięcej A β . Wiązanie z białkami ułatwia usuwanie peptydu, gdyż hamuje jego oddziaływanie z RAGE. Z krwi peptydy A β są transportowane i usuwane głównie przez wątrobę, w czym uczestniczy receptor LPR1. Podwiązanie przewodów wątrobowych prowadziło do wzrostu stężenia peptydów A β w surowicy krwi i do mniejszego ich wypływu z mózgu. Mniejsza ilość peptydów A β są usuwane przez nerki i śledzionę. Jednym z istotnych problemów było to czy cyrkulujące w organizmie peptydy A β mogą uczestniczyć w formowaniu mózgowych depozytów. Na modelach zwierzę-

cych wykazano, że obecne w krwiobiegu fragmenty APP: krótszy, tj. 28-aminokwasowy i fragmenty dłuższe, tj. 40 – i 42 – aminokwasowe mogły pokonywać barierę BBB naczyń kapilarnych [15].

PEPTYDY A β W PŁYNACH CIAŁA. POSZUKIWANIA BIOMARKERÓW DIAGNOSTYCZNYCH AD

W płynie CSF znajdują się liczne i różne produkty trawienia białka APP. W tej grupie peptydów poszukuje się markerów, które mogą mieć znaczenie diagnostyczne różnych chorób neurodegeneracyjnych, w tym i AD.

Rozpuszczalne formy APP w CSF (sAPP) jako biomarkery AD

Dzięki właściwości białka APP do wchodzenia w interakcje o charakterze jonowym i hydrofobowym wykazuje ono zdolność do asocjacji i do formowania homo – i/ lub heteromerycznych kompleksów z innymi rozpuszczalnymi formami APP, także obecnymi w CSF. Do rozpuszczalnych form APP (soluble APP, sAPP) należą sAPP α i sAPP β , a także wykryta ostatnio APP w postaci sAPPf (full-length APP, sAPPf) [6,10]. Analizie poddano całkowite stężenie rozpuszczalnych produktów trawienia APP, tj. sAPPt (sAPP total), na które składają się sAPP α i sAPP β , jako produkty aktywności alfa i beta sekretaz. Wyniki prac nie prowadziły jednak do istotnych z punktu widzenia diagnostyki wniosków [6]. Stosując metody immunoprecypitacji i chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią masową (nanoflow Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry, LC – MS/MS), oznaczono stężenie poszczególnych, rozpuszczalnych form sAPP α , i sAPP β , które pojawiają się w CSF osób zdrowych i chorych na AD w wyniku trawienia izoformy APP⁷⁷⁰ tego białka przez sekretazy alfa i beta. W przypadku obu badanych grup produktami trawienia białka przez alfa-sekretazy były peptydy: sAPP α -Q686 i sAPP α -K687, których stężenie w CSF wynosiło około 600-700 ng/ml i było 3,5-4 razy wyższe od stężeń form sAPP β . Natomiast produktami trawienia tej izoformy APP przez β -sekretazy były peptydy sAPP β -M671 i sAPP β -Y681, których stężenie wynosiło około 200 ng/ml. Nie odnotowano jednak różnic w stężeniach form rozpuszczalnych sAPP w CSF u osób zdrowych i u chorych na AD. Druga zastosowana w tym badaniu metoda (AlphaLISA i IBL) także nie pozwoliła na uchwycenie różnic w stężeniach form sAPP osób zdrowych i chorych na AD [6].

Obiecujące wydają się wyniki ostatnich badań, gdyż w CSF osób zdrowych zidentyfikowano obecność białka APP z w pełni zachowaną domeną cytoplazmatyczną, tzn. w jego pełnej formie, którą określono jako sAPPf. Rozpuszczalna forma APP może występować w CSF jako polimer w postaci heteromerów sAPPf/sAPP α , sAPP α /sAPP α i sAPPf/sAPPf. Nieznany jest mechanizm formowania sAPPf w komórce, a także droga i mechanizm przedostawania się jej do CSF. Wiadomo jednak, że forma ta w istotny sposób interferuje z innymi rozpuszczalnymi APP jak sAPP α czy sAPP β , także obecnymi w CSF. Stwierdzono także, że jego



stężenie w CSF u chorych na AD jest podniesione w porównaniu ze stężeniem w CSF u osób zdrowych, a co więcej, u chorych na AD pozostaje w korelacji ze stężeniem peptydu A β 1-42 w CSF. Obecnie trudno przesądzać czy sAPP β będzie miał znaczenie diagnostyczne [10].

Peptydy A β w ISF

Dzięki aktywności synaptycznej peptydy A β są uwalniane z neuronów do śródmiąższowej przestrzeni zewnątrzkomórkowej ISF. Stężenie tych peptydów w mózgu i w płynie ISF jest niezwykle ważne dla fizjologicznego procesu ich metabolizmu i dla patologicznego procesu amyloidozy. Stężenie peptydów A β w ISF jest zmienne i, jak wykazano, jest skorelowane z rytmem dobowym pracy mózgu. Wzrasta w stanie aktywności synaptycznej mózgu, gdy organizm nie śpi, a obniża się podczas snu. Trudno powiedzieć jaki wpływ na rozwój AD ma zaburzenie rytmu dobowego pracy mózgu [8,26,44,54,55].

Ze względów etycznych niemożliwe jest oznaczenie stężenia składników, w tym peptydów A β czy białka tau w ISF mózgu żyjących, zdrowych osób. Jednak badania takie są prowadzone u osób, które wymagają stałego monitorowania pracy mózgu, np. po ciężkich uszkodzeniach tego narządu. Poszukuje się korelacji między typem urazu, stopniem uszkodzenia mózgu, aktywnością synaptyczną po urazie a stężeniem rozpuszczalnych peptydów A β , nie tylko w relatywnie łatwiejszym do pobrania CSF, ale i w ISF mózgu. Badania takie zmierzają do zobrazowania dynamiki zmian stężenia tych peptydów w mózgu, a tym samym dają wiedzę o natężeniu ich akumulacji i eliminacji [36].

Ważnych wyników dostarczyły badania stężenia peptydów A β w ISF pacjentów poddanych stałemu wewnątrzczaszkowemu monitorowaniu stanu i pracy mózgu z powodu przebytego urazu mózgu. Badane osoby nie były chore na żadne formy demencji, w tym i na AD. Stosując wewnątrzmożgową dializę zebraanych płynów, określono w nich stężenia potencjalnych biomarkerów stanu i pracy uszkodzonego mózgu [7,35,58]. W płynie ISF osób po ciężkim uszkodzeniu mózgu zbadano stężenie peptydów A β . U badanych pacjentów średnie stężenie peptydów A β 1-42 określono na 253 pg/ml, a peptydu A β 1-40 na średnio 5421 pg/ml [36]. Wydaje się, że istnieje pewna korelacja pomiędzy stopniem uszkodzenia mózgu, liczbą doznanych urazów (jedno – bądź wielokrotnym urazem) a rozwojem AD. Przemawia za tym wzrost nierozpuszczalnych agregatów fibrylujących peptydów po urazach mózgu. Wykazano, że w miarę postępującej poprawy stanu pacjenta w jego płynie ISF podwyższeniu ulegało stężenie peptydów A β , a malało w przypadku pogarszających się parametrów pracy mózgu. Zmniejszenie stężenia fibrylujących peptydów można tłumaczyć ich deponowaniem w formie fibryli. Formowane są też wówczas liczne helikalne oligomery, najbardziej toksyczne formy fibrylujących peptydów.

Zmniejszonemu stężeniu peptydów A β , czyli pogarszającym się parametrom pracy mózgu, towarzyszył także wzrost stężenia białka tau w ISF [7,35]. Monitorowanie po urazie mózgu zmian stężenia peptydów A β w ISF być może pozwoli na uchwycenie i precyzyjne określenie istniejących zależności między stężeniem peptydów a aktywnością uszkodzonych aksonów [36].

Peptydy A β w CSF

W CSF znajduje się ogromna liczba różnych peptydów będących produktami wysoce specyficznego trawienia białka APP, w tym peptydy A β . Są one niezwykle ważne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Ponadto w CSF znajdują się także inne peptydy, istotne z punktu diagnostyki AD, jak np. białko tau [47,53].

Stężenie peptydów A β w CSF jest odzwierciedleniem tempa ich wytwarzania i procesu usuwania (clearance) z mózgu. Wyniki badań modeli zwierzęcych wskazują, że głównym źródłem tych peptydów w mózgu jest raczej APP neuronów, a nie są wytwarzane w innych komórkach i transferowane z krwiobiegu przez barierę BBB do mózgu i dopiero tu deponowane [43]. W stanie fizjologicznym w CSF osób zdrowych około 50% peptydów A β to A β 1-40, około 16% to peptyd A β 1-38, a 10% stanowi peptyd A β 1-42 [11,29]. U chorych na AD stężenie peptydów A β także obrazuje ich biodynamikę, zwiększone wytwarzanie i/lub obniżone tempo ich usuwania z mózgu, ale w warunkach odmiennych od prawidłowych, bo patologicznych [43]. Wraz z rozwojem choroby AD stężenia fibrylujących peptydów A β 1-42 i A β 1-40 w CSF zmieniają się, ale najważniejsze zmiany, z punktu widzenia klinicznego następują we wstępnych, w zasadzie bezobjawowych etapach rozwoju AD [4,34].

Peptyd A β 1-40 w CSF

Stężenie peptydu A β 1-40 w CSF u osób zdrowych jest kilkakrotnie (około czterokrotnie) wyższe niż peptydu A β 1-42 i jest wyrażane w nanogramach. Wynosi około 14,6 ng/ml. U osób chorych na AD stężenia peptydu A β 1-40 są na ogół nieco wyższe, bo wynoszą np. 16,6 ng/ml. Liczni autorzy potwierdzają wyższe stężenie A β 1-40 w CSF u chorych na AD w porównaniu ze stężeniem w CSF osób zdrowych. Podobną tendencję zaobserwowano także w surowicy krwi osób chorych na AD [32,42,43,47].

Peptyd A β 1-42 w CSF

W przeciwieństwie do stężenia peptydu A β 1-40 w CSF, które w początkowym okresie choroby pozostaje na stałym poziomie, stężenie peptydu A β 1-42 zmniejsza się i jest odwrotnie skorelowane ze stopniem zaawansowania choroby. Dotyczy to zarówno choroby określanej jako łagodne zaburzenia poznawcze (Mild Cognitive Impairment, MCI), która jest traktowana jako stan przejściowy między prawidłowym procesem starzenia się a łagodnym wczesnym otępieniem towarzyszącym chorobie AD, jak i rozwiniętej, pełnoobjawowej AD.

Obniżenie stężenia A β 1-42 w CSF następuje stosunkowo wcześniej w rozwoju AD. Dzieje się to długo, wiele lat, a przynajmniej dwie dekady zanim rozwiną się objawy choroby. Z tego względu peptyd ten jest uznawany za niezwykle istotny, choć nie jedyny marker diagnostyczny AD [18,21].

Przypuszcza się, że peptyd A β 1-42 jest szybciej niż peptyd A β 1-40 deponowany w mózgu chorych na AD. Początkowo, diagnostycznie nieuchwytny proces gromadzenia monomerów peptydu z czasem nasila się i postępuje wraz z wiekiem, by w końcu ujawnić się w formie gromadzonych depozytów amyloidu [34].

Stężenie peptydu A β 1-42 w CSF osób zdrowych mieści się w granicach 600-890 pg/ml, a nawet do 1110 pg/ml. U osób chorych na AD stężenie wynosi 445 – 614 pg/ml, a u chorych na inne formy demencji wynosi około 717 pg/ml/[13,23,24,32,47]. Oznacza to, że stężenie peptydu A β 1-42 w CSF u osób chorych na AD nie tylko nie wzrasta, ale jest niższe w porównaniu do stężenia w CSF u osób zdrowych. Wydaje się, że mniejsze stężenie peptydu A β 1-42 w CSF osób chorych na AD może odzwierciedlać mniej wydajny proces oczyszczania mózgu z tego peptydu, co prowadzi do wzmoczonego gromadzenia złogów amyloidu w mózgu chorych. Retencja peptydu A β 1-42 w mózgu w formie amyloidu sprawia, że są obniżone możliwości jego dyfuzji do CSF. Wzrost stężenia rozpuszczalnych oligomerów peptydów A β w płynie zewnątrzkomórkowym mózgu zaburza transmisję synaptyczną i uszkadza neurony [3,11].

Redukcję stężenia peptydu A β 1-42 w CSF można jedynie wstępnie traktować jako wskaźnik rozwoju i postępu AD, gdyż wydaje się, że dopiero stosunek pojawiających się form A β 42/A β 40 jest bardziej miarodajnym parametrem. Jest lepszym wskaźnikiem rozwoju AD niż samo stężenie A β 1-42. Sugeruje się nawet połączenie tego parametru ze stężeniem białka tau [32].

Białko tau w CSF

Stężenie całkowite białka tau (tau total, tauT) w CSF osób zdrowych wynosi 262 – 326 pg/ml, a u osób chorych na AD wyznaczono je w granicach 599 – 816 pg/ml, a w przypadku innych form demencji na 47 pg/ml. Stężenie formy fosforylowanej białka tau (Ptau) w CSF osób zdrowych wynosi 47 – 61 pg/ml, u osób chorych na AD stężenie to mieści się w granicach 82 – 95 pg/ml. U osób chorych na inne postaci demencji stężenie nie zmienia się istotnie i pozostaje na stałym poziomie około 47 pg/ml [13,24,33].

Stężenie A β 1-42 w surowicy

Stężenia peptydów A β 1-40 i A β 1-42 w surowicy krwi są znacząco niższe (około 10-20 razy) niż stężenia tych peptydów w CSF (Portelius E. – informacja prywatna). Wyniki ostatnich badań z zastosowaniem nowej techniki diagnostycznej oznaczania peptydów A β w surowicy

krwi ludzkiej, opartej na metodzie immunoprecypitacji i spektrometrii masowej, pozwoliły na identyfikację i na wyznaczenie stężeń kilkunastu (16) różnych peptydów A β w surowicy, które są N – bądź C-końcowymi produktami trawienia APP. Liczne z nich to peptydy typu A β . Pochodzenie i obecność tych peptydów w surowicy krwi nie jest jeszcze wyjaśnione. Wydaje się, że są wytwarzane w różnych komórkach i w narządach obwodowych, jak płytki krwi, komórki wątroby, płuc czy przez komórki ścian naczyń krwionośnych, a także przez połączenia nerwowo-mięśniowe w mięśniach szkieletowych. Niestety, nie uchwycono jednak wyraźnych korelacji pomiędzy stężeniem np. peptydu A β 1-42 w surowicy u osób zdrowych i chorych na AD. U osób zdrowych i chorych na AD wyznaczone stężenie tego peptydu było bardzo niskie i mieściło się w granicach 10-30 pg/ml. Wydaje się, że stężenie peptydu A β 1-42 w surowicy krwi u osób zdrowych jest niezależne od jego stężenia w CSF, które wynosi około 1000 pg/ml, natomiast u chorych na AD jest w przybliżeniu o połowę niższe i mieści się w zakresie 400-500 pg/ml [47,53].

Natomiast stężenie peptydu A β 1-40 w surowicy osób zdrowych mieści się w przedziałach 168 – 224 pg/ml, a u chorych na AD jest nieznacznie wyższe, bo wynosi około 270 pg/ml [42]. Dla peptydu A β 1-42 w surowicy osób zdrowych stężenie mieści się w przytoczonych już granicach, około 20 – 25 pg/ml, a dla chorych na AD stężenia te są tylko nieznacznie wyższe. Sugeruje się także, że obserwowane różnice nie są istotne i stężenia peptydów A β 1-40 i A β 1-42 w surowicy osób zdrowych i osób chorych na AD są w zasadzie podobne. Podobnie stężenia innych peptydów A β , np. A β 1-38 w surowicy krwi osób zdrowych i chorych na AD pozostają na niezmiennym poziomie [47].

Podwyższone stężenie peptydu A β 1-42 wykryto jednak w surowicy krwi pacjentów chorych na genetycznie uwarunkowaną postać rodzinną AD (early onset of familial AD) [43,53]. Wydaje się, że uchwycone wyższe stężenie peptydu A β 42 pojawia się długo przed rozwojem AD, w stadium przedklinicznym tej choroby. Wraz z jej postępem stężenie to ulega jednak obniżeniu, a za efekt ten może odpowiadać kompartmentacja mózgowych peptydów A β 1-42 [53].

Wiadomo jednak także, że stężenie peptydów A β w surowicy osób zdrowych wzrasta wraz z wiekiem [34]. U osób chorych na AD, w stadium przedklinicznym i na bardzo wczesnym etapie rozwoju AD, stężenie to jest wyraźnie podniesione w porównaniu do stężenia u zdrowej grupy kontrolnej. Jednak w miarę rozwoju choroby i wraz z upływem czasu choć stężenie to obniża się, jednak spadek następuje do poziomu obserwowanego u osób starszych, czyli do stężenia i tak wyższego. Zjawisko niezmiernie utrudnia interpretację wyników badań i proces diagnostyczny AD [52]. Sprawa komplikuje się jeszcze bardziej, gdy pacjentami są osoby pobierające insulinę. Wprowadzona do krwioobiegu insulina powoduje wzrost stężenia fibrylujących peptydów, np. peptydu A β 1-42 [27].



PEPTYDOWE BIOMARKERY AD W PŁYNACH CIAŁA A PROBLEMY DIAGNOSTYCZNE

Dane dotyczące stężenia peptydów A β w różnych płynach ciała w przebiegu AD budziły i nadal budzą liczne kontrowersje, gdyż niejednokrotnie są krańcowo rozbieżne [15]. Wyznacza się wartości tych stężeń i wydaje się, że przynajmniej do pewnego stopnia uzyskano konsensus. Problematiczną pozostaje jednak interpretacja wyników, a zwłaszcza poszukiwanie wzajemnych relacji w jakich analizowane peptydy pozostają w płynach ciała. Jest to ważna sprawa, zwłaszcza w kontekście wykorzystania takich wyników do poszukiwania biomarkerów choroby [4,15,32]

Ogólnie przyjmuje się, że stężenia także peptydów A β w surowicy są niższe od wartości ich stężeń w CSF. Mogą za to odpowiadać liczne czynniki, w tym obecność białek transportowych peptydów w surowicy krwi. Około 90% peptydów A β krążących w surowicy jest związanych z albuminą, α 2-makroglobuliną, lipoproteiną lub z innymi białkami. Kompleksowanie tych peptydów maskuje je, utrudniając detekcję i prawidłowe oznaczenie ich faktycznego stężenia w surowicy [34,53].

W surowicy krwi pacjentów chorych na AD typu późnego (late onset AD) w tzw. postaci sporadycznej (Sporadic Alzheimer's Disease, SAD), stężenie peptydu A β 1-42 pozostawało na poziomie stężenia u osób zdrowych, bez objawów demencji. W tej postaci choroby odkładanie mózgowych depozytów amyloidu jest prawdopodobnie uwarunkowane innymi czynnikami, np. zaburzeniami procesu syntezy bądź sekrecji lub zaburzeniami białek wiążących peptyd A β 1-42 [43,53].

Jednak u około 10-20% pacjentów chorych na SAD stężenie peptydu A β 1-42 było, z nieznanymi powodów, podniesione. Intrygujące są także obserwacje wskazujące na podniesione stężenie peptydu A β 1-42 w surowicy krwi osób zdrowych, ale blisko spokrewnionych (krewni pierwszego stopnia) z chorymi na AD, u których rozwój tej choroby nastąpił dużo później [43].

Wydawać by się mogło, że detekcja różnych biomarkerów, w tym peptydów A β , w różnych płynach ciała, a zwłaszcza w surowicy krwi, mogłaby być łatwym do pozyskania źródłem ważnych informacji o rozwoju choroby. Jednak w przypadku surowicy krwi istotną przeszkodą jest to, że stężenie peptydów A β , w tym i A β 1-42 w surowicy, nie pozostaje w korelacji ze stężeniem tych peptydów w CSF mózgu. Stężenie peptydu A β 1-42 w surowicy krwi nie odzwierciedla też natężenia zmian amyloidowych obserwowanych w mózgu chorych na AD [43]. Peptydy A β , w tym A β 1-42, nie są markerami swoistymi chorobowo, gdyż ich podniesione stężenie w surowicy towarzyszy także innym chorobom neurodegeneracyjnym mózgu [53]. Z tego powodu wartości tych stężeń nie są postrzegane jako właściwe i miarodajne markery rozwoju AD. Dlatego też niezwykle istotne są badania zmierzające do udoskonalenia standaryzowa-

nych metod ich oznaczania w surowicy krwi. Stałyby się niezwykle ważnym parametrem pomocnym w diagnostyce wielu chorób neurodegeneracyjnych, w tym i w chorobie AD [4,33,43,47].

Liczne wyniki dotychczasowych badań stężeń peptydów A β w surowicy są sprzeczne i nie pozwalają na wysunięcie jednoznacznych wniosków o ewentualnej korelacji stężenia a postępu choroby czy to MCI, czy choroby AD [34]. Wzajemne relacje pomiędzy stężeniem peptydów A β w surowicy, płynie CSF, ISF lub mózgu pozostają nadal raczej enigmatyczne. Obecnie, na podstawie aktualnej wiedzy, trudno jest wysnuć istotne, ostateczne wnioski. Wydaje się jednak, że peptydy A β rozpuszczone i krążące w surowicy krwi, dzięki istniejącej barierze krew-mózg i dzięki funkcjonującym mechanizmom ich dwukierunkowego transportu, powinny pozostawać jednak w stanie równowagi dynamicznej z pulą peptydów mózgowych. Wymaga to jednak dalszych i pogłębionych badań [53].

Można by sądzić, że w sytuacji rozwoju stanu patologicznego peptydy te mogłyby się stać wrażliwymi i swoistymi markerami, pozwalającymi na śledzenie i monitorowanie rozwoju choroby. Jak się jednak okazuje, poszukiwanie takich białek markerowych AD w grupie peptydów A β nie zostały, jak dotąd, uwieńczone sukcesem, ponieważ połowiczny czas życia tych peptydów jest krótki, bo kilkuminutowy, a ich stężenia w płynach ciała są różne w zależności od rodzaju peptydu [4,15].

Kolejne prace dostarczają nowych informacji, które, być może, pozwolą w przyszłości na rozbudowanie metod identyfikacji także i markerów surowicznych. Do badań wprowadzane są modyfikatory surowicznych peptydów A β , np. przeciwciała skierowane przeciwko peptydom A β (anti-A β antibody m266) i związki wpływające na stężenie peptydów, np. gangliozyd GM1, pochodne czerwieni Kongo, insulina, LRP, czy glukoza. Dąży się do wprowadzenia do badań takich związków, które podane dożylnie sprawią, iż mózgowy złoży amyloidu ujawnią swoje stężenie, pozostając w korelacji z ich stężeniem w surowicy krwi [53].

Badania składników CSF są niezwykle ważne w monitorowaniu choroby, dając obraz następujących zmian, ale głównie we wstępnych etapach jej rozwoju. Choć stosowane metody oznaczania tych składników są stosunkowo czułe i swoiste, to jednak, jak się okazuje, nie są wystarczające [4]. Należy pamiętać o trudnościach diagnostycznych wynikających z natury fizykochemicznej fibrylujących peptydów. Dotyczy to nie tylko peptydów typu A β , ale i innych obecnych w mózgu peptydów, np. trzustkowego neurohormonu – amyliny, także odnajdowanego w mózgu, a także białka tau. Peptydy te, ze względu na duże podobieństwo ich cech fizykochemicznych, uwarunkowanych budową aminokwasową, sprawiają podobne trudności eksperymentalne i diagnostyczne. Postać w jakiej pozostają w roztworze jest odmienna od tej, jaką przyjmują

w zetknięciu z powierzchnią np. kwarcu, czy polistyrenu. Zmiany konformacyjne, związane z procesami adsorpcji do powierzchni szkła, kryształu czy różnych rodzajów plastiku powodują, że łatwo i nieswoiście, ale silnie adsorbują do takiej powierzchni, co utrudnia zebranie poprawnych wyników. Białko tau też jest kłopotliwe diagnostycznie, ale w mniejszym stopniu, najprawdopodobniej z powodu ochronnej roli reszt kwasu fosforowego. Hiperfosforylacja białka tau znacząco obniża jego rozpuszczalność [31,35,37,38,39].

Wskaźnik Aβ42/Aβ40 w diagnostyce AD

Zmiany stężenia różnych biomarkerów w płynach ciała, a zwłaszcza w CSF, następują dużo wcześniej przed rozwinięciem się pierwszych klinicznych objawów choroby. Dlatego poznanie tych najistotniejszych markerów i uchwycenie najbardziej reprezentatywnych, bo swoistych dla danej jednostki chorobowej, jest niezwykle istotne z punktu widzenia diagnostyki medycznej. Oznaczane w CSF stężenie, zwłaszcza Aβ1-42, zależy od stanu fizjologicznego czy już stanu patologicznego potencjalnego pacjenta. W każdym przypadku jednak ważne jest poznanie stężeń wszystkich peptydów Aβ obecnych w CSF. Parametr taki może odzwierciedlać skuteczność i wydajność procesów formowania peptydów i ich usuwania z mózgu, a tym samym odzwierciedlać niejawny, ale już toczący się proces chorobowy [32].

Dobrym przykładem takiego podejścia jest wyznaczenie parametru będącego ilorazem stężeń form Aβ1-42 i Aβ1-40 w płynach ciała (Aβ42/Aβ40). Wydaje się, że lepiej odzwierciedla toczące się procesy metabolizmu białka APP niż samo stężenie peptydów Aβ1-42 czy Aβ1-40. Można w ten sposób uniknąć błędów wynikających z mylnej interpretacji wyników, jeśli dany pacjent ma, ze względu na różnice osobnicze, niskie lub wysokie stężenie wszystkich innych peptydów Aβ w płynach ciała, w tym i w CSF (wyniki fałszywie pozytywne bądź fałszywie negatywne) [32]. Ponieważ wraz ze stopniem zaawansowania choroby AD zmienia się stężenie peptydów Aβ, przy czym zmiana dla peptydu Aβ1-42 następuje dużo szybciej, wydaje się, że najlepszym parametrem opisującym postęp choroby może być wyznaczenie wzajemnych relacji stężeniowych peptydów, tj. wartości wskaźnika Aβ42/Aβ40. Za normę przyjmuje się wskaźnik 0,05, a dla chorych na AD wskaźnik jest niższy [Lewczuk – informacja prywatna, 32,34].

Redukcję stężenia peptydu Aβ1-42 w CSF można jedynie wstępnie traktować jako wskaźnik rozwoju i postępu AD, gdyż wydaje się, że to dopiero stosunek pojawiających się form Aβ42/Aβ40 jest bardziej miarodajnym parametrem. Jest on lepszym wskaźnikiem rozwoju AD niż samo stężenie Aβ42 [32]. Sugeruje się nawet połączenie tego parametru ze stężeniem białka tau. Wysłunęto zatem sugestię, że z dużą dozą pewności, choroba AD może być odróżniana od innych chorób demencyjnych na podstawie parametrów CSF, którymi są: obniżone stężenie peptydu Aβ1-42 i podwyższone stężenie całkowite białka

tau i/lub hiperfosforylowane białko tau, gdy fosforylacja dotyczy treoniny w pozycjach 181 i 231 tego białka. Prowadzi się również badania nad włączeniem do tej grupy biomarkerów CSF, także innych peptydów Aβ odnajdywanych w CSF, np.: Aβ1-38 czy białek stresu oksydacyjnego lub peptydów towarzyszących procesom zapalnym. Podobne prace, dotyczące materiału, który łatwiej jest pozyskać, tj. surowicy krwi, wymagają jeszcze czasu i kolejnych badań. Koncentrują się one wokół: czynnika komplementu H (complement factor H), alfa-2 makroglobuliny (alpha-2-macroglobulin) czy klusteryny (clusterin) [1].

PATOLOGICZNE DEPOZYTY ODNAJDYWANE W PRZEBIEGU CHOROBY ALZHEIMERA

W chorobie Alzheimer'a zmiany neuropatologiczne ujawniają się pojawianiem w określonych rejonach mózgu, a zwłaszcza w obszarze limbicznym i kory mózgu, różnych form patologicznych depozytów białkowych. Z najważniejszych wymienić należy: zewnątrzkomórkowe, tzw. płytki starcze (senile plaques, amyloid plaque) i zwyrodnienie neurofibrilarne (neurofibrillary) pod postacią patologicznych agregatów hiperfosforylowanego i poliubikwitynylowanego białka MAP-tau (Microtubule-Associated Proteins, MAP-tau), które są odkładane wewnątrzkomórkowo, w cytoplazmie neuronów [18,20,51]. W skład płytek starczych, wchodzi, odpowiadająca za typową dla amyloidu reakcję z tioflawiną S (Thioflavine S, ThS), amyloidowy rdzeń fibryli, a także dystroficzne neuryty oraz komórki aktywowanego astro – i mikrogleju [41,45].

Natomiast białko tau, w postaci około 10 nm fibryli tworzy tzw. splątki lub sploty neurofibrilarne (Neurofibrillary Tangles, NFTs), które po rozpadzie uszkodzonego neuronu także lokują się poza obrębem komórki. Splątki NFT mogą być wzbogacone w: prawo – lub lewoskrętne, podwójne helikalne filamenty określane skrótem PHF (Paired Helical Filaments, PHF), na które składają się: ubikwityna, triady białek neurofilamentów i różne peptydy beta-amyloidowe, a także komórki mikrogleju. Obie formy depozytów są wzbogacone również w szkodliwe końcowe produkty wzmożonej glikacji (Advanced Glycation End products, AGEs) [11,41].

Identyfikacja depozytów amyloidowych w mózgu chorych jest diagnostycznym kryterium rozstrzygającym o rozpoznaniu AD, choć zaznaczyć należy, że złoży takie są obserwowane w mózгах osób chorych także na inne choroby, jak np. syndrom Downa (Down's syndrome, DS), pewne formy epilepsji, a także na cukrzycę typu 2 [17,20,22,41]. Obecność splątków jest mniej swoista dla AD, gdyż pojawiają się także w przebiegu innych chorób neurologicznych, np. postępującego porażenia nadjądrowego (progressive supranuclear palsy), degeneracji korowej (corticobasal degeneration) i w pewnych odmianach chorób otępiennych, np. otępieniu czołowo-skroniowym (frontotemporal dementia) [18,19].



Okazuje się, że pewne regiony mózgu, np. ciało prążkowane (striatum) obszaru podkorowego (subcortical) czy obszar wzgórza wzrokowego (thalamus) są szczególnie podatne na odkładanie się złogów amyloidu. W regionach tych proces rozpoczyna się szczególnie wcześniej, tj. np. we wstępnym etapie rozwoju dziedzicznej autosomalnej tzw. rodzinnej postaci choroby AD (Familial Alzheimer's Disease, FAD). W tym przypadku nasilone deponowanie amyloidu w strefie obszaru podkorowego jest, jak się przypuszcza, związane z zaburzeniami metabolizmu białka APP. Zależna od obszaru mózgu obecność białka APP i C-końcówych fragmentów trawienia tego białka ma znaczenie w przypadku tej postaci AD. Postaci FAD, w większym stopniu niż formie SAD, towarzyszy też patologia białka tau w obszarze ciała prążkowanego.

Natomiast postaci SAD towarzyszy zróżnicowana, bo nasilona w obszarze korowym, akumulacja peptydów A β 1-42, co może być uwarunkowane wzmoczoną aktywnością synaptyczną w tym regionie mózgu. W przypadku tej postaci AD, z metabolizmem peptydów A β , jest związana ekspresja białka struktury zwanej gęstością postsynaptyczną kinazy guanozynowej, tj. PSD95 (Postsynaptic Density protein 95), markera aktywnych, pobudzonych synaps, znanego jako DLG4 [51].

PEPTYDY A β W AMYLOIDOWYCH PŁAKACH MÓZGU

Ilość gromadzonych peptydów A β jest wypadkową kilku procesów: procesu formowania tych peptydów w następstwie syntezy, czyli procesu trawienia przez sekretazy błonowe prekursorowego białka APP, procesu dwukierunkowego ich transportu przez BBB, a następnie procesu ich usuwania i tempa tego procesu. Wydaje się, że w przypadku formy FAD mutacje białka APP i/lub presenilin są przyczyną wytwarzania i gromadzenia w nadmiarze złogów peptydów A β . W pozostałych przypadkach choroby AD gromadzenie złogów fibrylujących peptydów jest konsekwencją zaburzonego szeroko rozumianego procesu ich usuwania. Na pojęcie to składają się takie etapy, jak: enzymatyczna degradacja APP, przepływ CSF i transport w obrębie CUN przez barierę BBB [15].

Zachowanie integralności bariery BBB jest podstawowym warunkiem do prawidłowego przebiegu procesu mózgowej wymiany peptydów, w tym peptydów A β . Liczne czynniki patologiczne, np. czynniki naczyniowe w cukrzycy, choroby serca, w tym nadciśnienie czy przebyty udar wpływają na każdy z powyższych etapów, zaburzając je i prowadząc do akumulacji peptydów A β w mózgu. W rozwoju neurodegeneracyjnych zmian chorobowych niezwykle ważny jest także proces wewnątrzneuronalnego gromadzenia hiperfosforylowanego białka tau w formie NFTs [11]. Każda forma dysfunkcji naczyń zaburza proces usuwania peptydów i sprzyja ich odkładaniu się w ścianach naczyń krwionośnych. Jest to obserwowane w przebiegu AD. W procesie obniżania stężenia peptydów w mózgu rolę odgrywają

też inne czynniki, jak np. enzymy degradujące insulinę czy neprylizyna [2].

Zaburzenie któregokolwiek ze szlaków usuwania bądź degradacji rozpuszczalnych peptydów A β z mózgu prowadzi do ich akumulacji, wzrostu stężenia, a w konsekwencji do tłoku molekularnego w roztworze i do zmian strukturalnych monomerów, wprowadzając je na szlak formowania toksycznych oligomerów, a w końcu do formowania większych polimerów i fibryli, które jako nietoksyczna forma peptydów, są deponowane w postaci nierozpuszczalnych złogów amyloidowych. Sugeruje się, że złogi te stanowią formę usuwania fibrylujących peptydów z roztworu [2,16].

W skład depozytów amyloidowych mózgu wchodzi liczne i różnorodne formy peptydów A β [45]. Polipeptydy te głównie kończą się na aminokwasie w pozycji 42, ale pod względem budowy N-końca przedstawiają formy wysoce różnorodne. Jak się okazuje, duży odsetek amyloidu stanowią nowo identyfikowane formy peptydu A β , tj. N-końcowe produkty trawienia fibrylującej domeny. Wiele z nich jest modyfikowana kwasem piroglutaminowym (5-oksoprolina). Głównie są to wspomniane już formy rozpoczynające się od glutaminy w pozycji 3, od fenyloalaniny w pozycji 4, a także, nieco mniej liczne peptydy rozpoczynające się w pozycji 2 czy 5 odpowiednio od alaniny czy argininy [45,48]. Polipeptyd A β 1-42, deponowany w plakach stosunkowo wcześniej w czasie rozwoju AD, jest traktowany wręcz jako czynnik inicjujący kaskadę zmian komórkowych, zachodzących w mózgu chorych i prowadzących do formowania fibryli amyloidowych, a następnie obserwowanych jako patologiczne złogi amyloidu [43].

Na podstawie analizy mysich modeli AD przypuszcza się, że plaki amyloidowe, odnajdywane w mózgach zwierząt i u chorych na AD, w skład których wchodzi głównie peptyd A β 1-42, nie są jednak neurotoksyczne. Wydaje się, że stanowią one pulę „zmagazynowanych” rozpuszczalnych monomerów i oligomerów peptydu, upakowanego w uporządkowane struktury wyższego rzędu, tj. w fibryle amyloidowe. Zgromadzone i zdeponowane w ten sposób monomery pozostają w stanie równowagi z rozpuszczonymi w CSF formami mono – czy oligomerycznymi peptydu A β . Stężenie peptydu A β w CSF rzuca na stan osiągniętej równowagi stężeniowej obydwu pul peptydu: puli rozpuszczalnego A β i zdeponowanego w formie fibryli [21].

Wiadomo, że za neurotoksyczność i efekty patologiczne jest odpowiedzialna forma oligomeryczna nie tylko tego, ale i innych amyloidogennych peptydów, która powstaje w jednym ze wstępnych etapów procesu fibrylogenezy [37]. Co więcej, stwierdzono, że zmniejszeniu plak amyloidowych na skutek stosowanych terapii nie towarzyszy poprawa stanu fizjologicznego pacjentów chorych na AD. Natomiast u zwierząt eksperymentalnych, mimo stosowanej terapii prowadzącej do zmniejszenia objęto-

ści istniejących złogów, nadal obserwowano postępujące uszkodzenie synaps.

Wyniki badań wskazywały na inny ważny czynnik promujący rozwój i postęp choroby. Jest nim wewnątrzkomórkowa pula rozpuszczalnych peptydów A β , która pozostaje w stanie równowagi ze wspomnianą pulą zewnątrzkomórkowo deponowanych fibryli. Ponadto zaobserwowano, że z zewnątrzkomórkowej puli peptydów A β neurony „pobierają” te peptydy i inkorporują je do puli wewnątrzkomórkowej. Zjawisko to może zapoczątkować wewnątrzneuronalny proces amyloidogenezy, czyli autoagregację peptydu. Trudno stwierdzić, czy w ten sposób następuje wprowadzanie do komórki ziaren fibrylacji, rozpoczynających fibrylogenezę od zjawiska tzw. zasiewania roztworu (seeding). Mechanizmy wzajemnych relacji w jakich pozostają obie te pule peptydów są jeszcze nierozpoznane [21]. Stwierdzono, że wewnątrzneuronalna pula peptydu odpowiada jednak za utratę neuronów [17]. Zaobserwowano także, że zabiegi terapeutyczne oparte na przeciwciałach, skierowanych przeciwko peptydom A β , prowadzą do poprawy funkcji poznawczych badanych zwierząt, mimo że pozostają bez wpływu na ilość zdeponowanego już amyloidu mózgowego [18].

Należy także zauważyć, że stężenie różnych peptydów A β , obecnych i oznaczanych w CSF, odzwierciedla jedynie pulę ich form rozpuszczalnych i choć pozostaje w stanie równowagi z formami deponowanymi w formie fibryli, to jednak nie może stanowić źródła wiedzy o ich ilości już zdeponowanych w amyloidzie [17,60]. Amyloid może działać także jako czynnik autoaktywujący formowanie fibryli, gdyż sprzyja formowaniu odpowiednio zmienionego, patologicznego środowiska w komórce. Amyloid jest też czynnikiem aktywującym komórki mikrogleju, a także jest czynnikiem indukującym cytokiny wzmagające stan zapalny, np. interleukinę 1 (IL-1) czy czynnik martwicy nowotworów typu alfa (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF- α). Czynniki te współdziałają na zasadzie sprzężenia zwrotnego [30].

ZAKOŃCZENIE

Coraz więcej wiadomo na temat różnorodności form peptydowych produktów trawienia białka APP identyfikowanych w płynach mózgu, a zwłaszcza w CSF, ich biodystrybucji i mechanizmów ich usuwania z mózgu.

Nie znamy jednak jeszcze odpowiedzi na intrygujące z punktu widzenia naukowego liczne pytania, np. jak dochodzi do subtelnych zmian konformacyjnych formy

prawidłowej, fizjologicznie czynnej, cząsteczki peptydu, np. peptydów typu A β i jej przeistoczenie w fibrylarny depozyt mózgowy. Nie wiadomo też na jakim etapie powstawania różnych peptydowych produktów degradacji białka APP, w tym i peptydów typu A β , następują zmiany formy prawidłowej peptydu w patologiczną, bo szkodliwą dla neuronów. Nie wszystko jednak wiadomo o ich biodystrybucji w płynach i strukturach mózgu.

Kolejne badania przynoszą nową wiedzę i nowe informacje dotyczące biologii nie tylko tego, ale i innych peptydów będących produktami degradacji białka APP. Stawiają tym samym i nowe pytania. Na plan pierwszy wysuwają się pytania o różnorodność peptydów typu A β w różnych płynach ciała. Okazuje się, że tych peptydów jest znacznie więcej niż jak dotąd sądzono. Podstawowe są pytania: jakie są to peptydy, w jakich warunkach środowiskowych komórki są formowane i jaka jest ich rola w fizjologii na poziomie komórki i organizmu, a także, ewentualnie, w patofizjologii różnych schorzeń.

Ich biodystrybucja, choćby w obrębie mózgu, nadal pozostaje nierozpoznana. Pytania dotyczą także mechanizmów ich usuwania z tego narządu. Podobne pytania dotyczą ich obecności w innych, oprócz mózgu, narządach organizmu, np. w węzłach chłonnych czy w trzustce. Inna ważna kwestia dotyczy potencjału fibrylotwórczego tych nowo odkrywanych peptydów, ukrytego w strukturze aminokwasowej ich cząsteczek oraz rola powstających oligomerów i w końcu fibryli w procesach chorobowych.

Takich pytań jest dużo więcej, a wiele z nich jest natury fundamentalnej. Należy bowiem podkreślić, że nie jest nawet pewne czy obserwowane zjawisko fibrylacji jest przyczyną schorzeń, którym towarzyszą, czy stanowi jedynie jeden z trudno uchwytnych, ale tylko objawów ich rozwoju. Nawet natura takich schorzeń nie jest obecnie dostatecznie zdefiniowana. Przykładem jest właśnie choroba Alzheimera, wiązana z peptydami typu A β i cukrzyca typu 2 wiązana z amyliną. Jak się okazuje obie jednostki chorobowe łączą nie tylko fibrylujące peptydy, ale mają liczne, wspólne mechanizmy asocjacji, co prowadzi do podstawowego pytania: czy jest to jedna, czy dwie odrębne choroby

Choć coraz więcej wiadomo o fibrylujących peptydach, to jednak nie znaczy że wystarczająco dużo, by móc uporać się z problemami medycznymi w jakie są one zaangażowane. Obecnie trudno nawet przewidzieć i zarysować, choćby w przybliżeniu, granice tego poznania. Jednak wiedząc więcej potrafimy pytać głębiej i celniej.



PIŚMIENNICTWO

- [1] Ballard C., Gauthier S., Corbett A., Brayne C., Aarsland D., Jones E.: Alzheimer's disease. *Lancet*, 2011; 377: 1019-1031
- [2] Bell R.D., Zlokovic B.V.: Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 2009; 118: 103-113
- [3] Blennow K., Dubois B., Fagan A.M., Lewczuk P., de Leon M.J., Hampel H.: Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*, 2015; 11: 58-69
- [4] Blennow K., Hampel H., Weiner M., Zetterberg H.: Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.*, 2010; 6: 131-144
- [5] Brinker T., Stopa E., Morrison J., Klinge P.: A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS*, 2014; 11: 10
- [6] Brinkmalm G., Brinkmalm A., Bourgeois P., Persson R., Hansson O., Portelius E., Mercken M., Andreasson U., Parent S., Lipari F., Ohrfelt A., Bjerke M., Minthon L., Zetterberg H., Blennow K., Nutu M.: Soluble amyloid precursor protein α and β in CSF in Alzheimer's disease. *Brain Res.*, 2013; 1513: 117-126
- [7] Brody D.L., Magnoni S., Schwetye K.E., Spinner M.L., Esparza T.J., Stocchetti N., Zipfel G.J., Holtzman D.M.: Amyloid- β dynamics correlate with neurological status in the injured human brain. *Science*, 2008; 321: 1221-1224
- [8] Chow V.W., Mattson M.P., Wong P.C., Gleichmann M.: An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromol. Med.*, 2010; 12: 1-12
- [9] Cirrito J.R., Holtzman D.M.: Amyloid β and Alzheimer disease therapeutics: the devil may be in the details. *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 321-323
- [10] Cuchillo-Ibañez I., Lopez-Font I., Boix-Amorós A., Brinkmalm G., Blennow K., Molinuevo J.L., Sáez-Valero J.: Heteromers of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid. *Mol. Neurodegener.*, 2015; 10: 2
- [11] Di Fede G., Catania M., Morbin M., Giaccone G., Moro M.L., Ghidoni R., Colombo L., Messa M., Cagnotto A., Romeo M., Stravalaci M., Diomedè L., Gobbi M., Salmona M., Tagliavini F.: Good gene, bad gene: New APP variant may be both. *Prog. Neurobiol.*, 2012; 99: 281-292
- [12] Do T.M., Alata W., Dodacki A., Traversy M.T., Chacun H., Pradier L., Scherrmann J.M., Farinotti R., Calon F., Bourasset F.: Altered cerebral vascular volumes and solute transport at the blood-brain barriers of two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 2014; 81: 311-317
- [13] Duits F.H., Teunissen C.E., Bouwman F.H., Visser P.J., Mattsson N., Zetterberg H., Blennow K., Hansson O., Minthon L., Andreasen N., Marcusson J., Wallin A., Rikkert M.O., Tsolaki M., Parnetti L. i wsp.: The cerebrospinal fluid "Alzheimer profile": easily said, but what does it mean? *Alzheimers Dement.*, 2014; 10: 713-723
- [14] Engelhard B., Sorokin L.: The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin. Immunopathol.*, 2009; 31: 497-511
- [15] Erickson M.A., Banks W.A.: Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.*, 2013; 33: 1500-1513
- [16] Fändrich M., Schmidt M., Grigorieff N.: Recent progress in understanding Alzheimer's β -amyloid structures. *Trends Biochem. Sci.*, 2011; 36: 338-345
- [17] Gouras G.K.: Convergence of synapses, endosomes, and prions in the biology of neurodegenerative diseases. *Int. J. Cell Biol.*, 2013; 2013: 141083
- [18] Gouras G.K., Olsson T.T., Hansson O.: β -amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 2015; 12: 3-11
- [19] Gouras G.K., Tampellini D., Takahashi R.H., Capetillo-Zarate E.: Intraneuronal β -amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 2010; 119: 523-541
- [20] Gouras G.K., Willén K., Faideau M.: The inside-out amyloid hypothesis and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.*, 2014; 13: 142-146
- [21] Gouras G.K., Willén K., Tampellini D.: Critical role of intraneuronal A β in Alzheimer's disease: technical challenges in studying intracellular A β . *Life Sci.*, 2012; 91: 1153-1158
- [22] Haass C., Kaether C., Thinakaran G., Sisodia S.: Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2012; 2: a006270
- [23] Hansson O., Stomrud E., Vanmechelen E., Östling S., Gustafson D.R., Zetterberg H., Blennow K., Skoog I.: Evaluation of plasma A β as predictor of Alzheimer's disease in older individuals without dementia: a population-based study. *J. Alzheimers Dis.*, 2012; 28: 231-238
- [24] Hansson O., Zetterberg H., Buchhave P., Londos E., Blennow K., Minthon L.: Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol.*, 2006; 5: 228-234
- [25] Iliff J.J., Wang M., Liao Y., Plogg B.A., Peng W., Gudersen G.A., Benveniste H., Vates G.E., Deane R., Goldman S.A., Nagelhus E.A., Nedergaard M.: A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci. Transl. Med.*, 2012; 4: 147ra111
- [26] Kang J.E., Lim M.M., Bateman R.J., Lee J.J., Smyth L.P., Cirrito J.R., Fujiki N., Nishino S., Holtzman D.M.: Amyloid- β dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science*, 2009; 326: 1005-1007
- [27] Karczewska-Kupczewska M., Lelental N., Adamska A., Nikolajuk A., Kowalska I., Górska M., Zimmermann R., Kornhuber J., Strączkowski M., Lewczuk P.: The influence of insulin infusion on the metabolism of amyloid β peptides in plasma. *Alzheimers Dement.*, 2013; 9: 400-405
- [28] Kress B.T., Iliff J.J., Xia M., Wang M., Wei H.S., Zeppenfeld D., Xie L., Kang H., Xu Q., Liew J.A., Plog B.A., Ding F., Deane R., Nedergaard M.: Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann. Neurol.*, 2014; 76: 845-861
- [29] Kumar V.B., Farr S.A., Flood J.F., Kamlesh V., Franko M., Banks W.A., Morley J.E.: Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides*, 2000; 21: 1769-1775
- [30] Kyrtos C.R., Baras J.S.: The glymphatic system and Alzheimer's disease: possible connection? *BIOTECHNO: The Sixth International Conference on Bioinformatics, Biocomputational Systems and Biotechnologies*, 2014; 15: 19
- [31] Lewczuk P.: Neurochemiczna diagnostyka chorób otępiennych. W: *Choroby otępienne. Teoria i praktyka*. red. J. Leszek, Wyd. II, Continuo, Wrocław 2011, 371-385
- [32] Lewczuk P., Lelental N., Spitzer P., Maler J.M., Kornhuber J.: Amyloid- β 42/40 cerebrospinal fluid concentration ratio in the diagnostics of Alzheimer's disease: validation of two novel assays. *J. Alzheimers Dis.*, 2015; 43: 183-191
- [33] Lewczuk P., Mroczko B., Fagan A., Kornhuber J.: Biomarkers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a current perspective. *Adv. Med. Sci.*, 2015; 60:76-82
- [34] Lopez O.L., Kuller L.H., Mehta P.D., Becker J.T., Gach H.M., Sweet R.A., Chang Y.F., Tracy R., DeKosky S.T.: Plasma amyloid levels and

the risk of AD in normal subjects in the Cardiovascular Health Study. *Neurology*, 2008; 70: 1664-1671

- [35] Magnoni S., Esparza T.J., Conte V., Carbonara M., Carrabba G., Holtzman D.M., Zipfel G.J., Stocchetti N., Brody D.L.: Tau elevations in the brain extracellular space correlate with reduced amyloid- β levels and predict adverse clinical outcomes after severe traumatic brain injury. *Brain*, 2012; 135: 1268-1280
- [36] Marklund N., Farrokhnia N., Hånell A., Vanmechelen E., Enblad P., Zetterberg H., Blennow K., Hillered L.: Monitoring of β -amyloid dynamics after human traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 2014; 31: 42-55
- [37] Marszałek M.: Amylina w badaniach eksperymentalnych. Fibrylacja – cytotoksyczna agregacja polipeptydu trzustki. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 309-319
- [38] Marszałek M.: Amylina w badaniach eksperymentalnych. Fibrylotwórczy polipeptyd amyloidu trzustkowego. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 14-24
- [39] Marszałek M.: Amylina w badaniach eksperymentalnych. Fibrylotwórczy polipeptydowy hormon trzustki. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 29-41
- [40] Marszałek M.: Amylina. Nowe mechanizmy regulacyjne fibrylującego hormonu trzustki – wybrane aspekty. *Post. Biol. Kom.*, 2015; 1: 1-23
- [41] Marszałek M.: Cukrzyca typu 2 a choroba Alzheimera – jedna czy dwie choroby? Mechanizmy asocjacji. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 653-671
- [42] Mehta P.D., Pirttilä T., Mehta S.P., Sersen E.A., Aisen P.S., Wisniewski H.M.: Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid β proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.*, 2000; 57: 100-105
- [43] Mehta P.D., Pirttilä T., Patrick B.A., Barshatzky M., Mehta S.P.: Amyloid β protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease. *Neurosci. Lett.*, 2001; 304: 102-106
- [44] Moghekar A., O'Brien R.J.: Con: Alzheimer's disease and circadian dysfunction: chicken or egg? *Alzheimers Res. Ther.*, 2012; 4: 26
- [45] Oberstein T.J., Spitzer P., Klafki H.W., Linning P., Neff F., Knölker H.J., Lewczuk P., Wiltfang J., Kornhuber J., Maler J.M.: Astrocytes and microglia but not neurons preferentially generate N-terminally truncated A β peptides. *Neurobiol. Dis.*, 2015; 73: 24-35
- [46] Pahnke J., Langer O., Krohn M.: Alzheimer's and ABC transporters – new opportunities for diagnostics and treatment. *Neurobiol. Dis.*, 2014; 72: 54-60
- [47] Pannee J., Törnqvist U., Westerlund A., Ingelsson M., Lannfelt L., Brinkmalm G., Persson R., Gobom J., Svensson J., Johansson P., Zetterberg H., Blennow K., Portelius E.: The amyloid- β degradation pattern in plasma – a possible tool for clinical trials in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, 2014; 573: 7-12
- [48] Portelius E., Lashley T., Westerlund A., Persson R., Fox N.C., Blennow K., Revesz T., Zetterberg H.: Brain amyloid-beta fragment signatures in pathological ageing and Alzheimer's disease by hybrid immunoprecipitation mass spectrometry. *Neurodegener. Dis.*, 2015; 15: 50-57
- [49] Ransohoff R.M.: Physiology. Good barriers make good neighbors. *Science*, 2014; 346: 36-37
- [50] Sakka L., Coll G., Chazal J.: Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.*, 2011; 128: 309-316
- [51] Shinohara M., Fujioka S., Murray M.E., Wojtas A., Baker M., Rovet-Lecrux A., Rademakers R., Das P., Parisi J.E., Graff-Radford N.R., Petersen R.C., Dickson D.W., Bu G.: Regional distribution of synaptic markers and APP correlate with distinct clinicopathological features in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Brain*, 2014; 137: 1533-1549
- [52] Takeda S., Sato N., Morishita R.: Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Front. Aging Neurosci.*, 2014; 6: 171
- [53] Takeda S., Sato N., Rakugi H., Morishita R.: Plasma β -amyloid as potential biomarker of Alzheimer disease: possibility of diagnostic tool for Alzheimer disease. *Mol. Biosyst.*, 2010; 6: 1760-1766
- [54] Tampellini D., Gouras G.K.: Synapses, synaptic activity and intraneuronal A β in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.*, 2010; 2: 2
- [55] Tampellini D., Rahman N., Lin M.T., Capetillo-Zarate E., Gouras G.K.: Impaired β -amyloid secretion in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neurosci.*, 2011; 31: 15384-15390
- [56] Thrane A.S., Rappold P.M., Fujita T., Torres A., Bekar L.K., Takanoto T., Peng W., Wang F., Thrane V., Eneger R., Haj-Yasein N.N., Skare Ø., Holen T., Klungland A., Ottersen O.P., Nedergaard M., Nagelhus E.A.: Critical role of aquaporin-4 (AQP4) in astrocytic Ca²⁺ signaling events elicited by cerebral edema. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 846-851
- [57] Thrane A.S., Rangroo Thrane V., Nedergaard M.: Drowning stars: reassessing the role of astrocytes in brain edema. *Trends Neurosci.*, 2014; 37: 620-628
- [58] Tsitsopoulos P.P., Marklund N.: Amyloid- β peptides and tau protein as biomarkers in cerebrospinal and interstitial fluid following traumatic brain injury: a review of experimental and clinical studies. *Front. Neurol.*, 2013; 4: 79
- [59] Umeda T., Tomiyama T., Sakama N., Tanaka S., Lambert M.P., Klein W.L., Mori H.: Intraneuronal amyloid β oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J. Neurosci. Res.*, 2011; 89: 1031-1042
- [60] van Gool W.A., Kuiper M.A., Walstra G.J., Wolters E.C., Bolhuis P.A.: Concentrations of amyloid β protein in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 1995; 37: 277-279
- [61] Veening J.G., Barendregt H.P.: The regulation of brain states by neuroactive substances distributed via the cerebrospinal fluid; a review. *Cerebrospinal. Fluid Res.*, 2010; 7: 1
- [62] Weller R.O., Djuanda E., Yow H.Y., Carare R.O.: Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol.*, 2009; 117: 1-14
- [63] Weller R.O., Subash M., Preston S.D., Mazanti I., Carare R.O.: Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain. Pathol.*, 2008; 18: 253-266
- [64] Wirths O., Bayer T.A.: Intraneuronal A β accumulation and neurodegeneration: lessons from transgenic models. *Life Sci.*, 2012; 91: 1148-1152

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.

