



«Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας»

«Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση»

Πτυχιακή / Διπλωματική Εργασία

«Μέθοδοι Προσδιορισμού Μοριακών Βιοδεικτών για την ασθένεια
Alzheimer»

Κωνσταντίνα Ζυγουβέλη

Επιβλέπων καθηγητής/Επιβλέπουσα καθηγήτρια: «Μαλβίνα Όρκουλα»

Πάτρα, Ιούνιος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του/της φοιτητή/φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίας στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

«Μέθοδοι Προσδιορισμού Μοριακών Βιοδεικτών για την ασθένεια
Alzheimer»

«Κωνσταντίνα Ζυγουβέλη»

Επιτροπή Επίβλεψης Πτυχιακής / Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής/Επιβλέπουσα
Καθηγήτρια:

«Μαλβίνα Όρκουλα»

«Επίκουρος Καθηγήτρια Ενόργανης
Φαρμακευτικής Ανάλυσης,

Τμήμα Φαρμακευτικής Πανεπιστημίου
Πατρών»

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής/Συν-
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

«Θεόδωρος Χριστόπουλος»

«Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών»

Πάτρα, Ιούνιος 2024

«Ευχαριστίες ή Αφιέρωση»

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
ABSTRACT.....	7
Εισαγωγή.....	8
Εγκέφαλος : Δομή και Λειτουργία.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : Νόσος Alzheimer.....	10
1.1. Εισαγωγή.....	10
1.1.1. Αίτια.....	11
1.1.2 Παθοφυσιολογία.....	12
1.1.2.1 Γενετική Βάση της Νόσου Αλτσχάιμερ.....	15
1.1.3 Θεραπεία / Διαχείριση.....	16
Κεφάλαιο 2 : Διαγνωστικές προσεγγίσεις της νόσου.....	19
2.1. Εισαγωγή.....	19
2.2 Επigenετικοί μηχανισμοί ως βιοδείκτες.....	21
2.3. Βιοδείκτες.....	22
2.3.1. Διαγνωστικοί βιοδείκτες.....	23
2.3.2. Βιοδείκτες αίματος και υγρών.....	24
2.3.2.1 Βιοδείκτες με βάση το αίμα.....	25
• B-Αμυλοειδές (Αβ) στο πλάσμα.....	25
• Πρωτεΐνη Ταυ πλάσματος.....	28
2.3.2.2. Ρευστοί βιοδείκτες του συναπτικού εκφυλισμού.....	31
• Νευρογκρανίνη (Ng).....	31
• NFL (neurofilament light).....	33
2.3.2.3 Βιοδείκτες νευροφλεγμονής.....	34
2.3.2.4 Πρωτεϊνικοί βιοδείκτες και δοκιμασία PEA (Proximity extension assay).....	37
• Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR).....	37
• Παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (PP).....	38
2.3.2.5. MicroRNAs (miRNAs).....	39
2.3.2.6. Οφθαλμικοί δείκτες.....	44
2.3.2.6.1 Δομικοί βιοδείκτες.....	45
2.3.2.6.2 Λειτουργικοί βιοδείκτες.....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	46
3.1. Προκλήσεις και προβλήματα στην επικύρωση των βιοδεικτών.....	46
3.2 Συμπεράσματα.....	47
Βιβλιογραφία.....	48

Περίληψη

Η νόσος Alzheimer είναι μια χρόνια νευροεκφυλιστική διαταραχή και αποτελεί το συχνότερο αίτιο της άνοιας. Υπολογίζεται ότι είναι η έβδομη αιτία θανάτου στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2022 και ότι το 2050 ο αριθμός των ασθενών παγκοσμίως θα ανέρχεται στα 150 εκατομμύρια. Η κύρια κλινική εκδήλωσή της είναι η διαταραχή στη μνήμη αλλά σταδιακά επηρεάζονται και άλλες νευρικές λειτουργίες επιβαρύνοντας τη κοινωνική ζωή του ασθενούς. Πρόκειται για μια ασθένεια που έχει μεγάλο κοινωνικό και οικονομικό κόστος καθώς δε θεραπεύεται και ο ασθενής χρειάζεται συνεχή επίβλεψη και φροντίδα. Η έγκαιρη διάγνωση της νόσου είναι κρίσιμη ώστε να αρχίσει άμεσα η φαρμακευτική αγωγή που μπορεί να καθυστερήσει την εξέλιξη της νόσου και να βελτιώσει τη ποιότητα ζωής του ασθενούς.

Στη παρούσα εργασία γίνεται μια προσπάθεια διερεύνησης των διαγνωστικών προσεγγίσεων με ιδιαίτερη έμφαση στην μελέτη των βιοδεικτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την έγκαιρη διάγνωση, την σταδιοποίηση της ασθένειας αλλά και την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπευτική αγωγή. Στην εισαγωγή γίνεται μια αναφορά στη δομή του εγκεφάλου και στο τρόπο μεταβίβασης των νευρικών ερεθισμάτων. Στο πρώτο κεφάλαιο, γίνεται αναφορά στη παθοφυσιολογία και τα αίτια της νόσου. Στο δεύτερο κεφάλαιο, παρουσιάζονται οι σημαντικότεροι βιοδείκτες που έχουν μελετηθεί καθώς και βιοδείκτες που βρίσκονται υπό μελέτη. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στους βιοδείκτες που ανιχνεύονται στο αίμα και τα υγρά καθώς είναι αυτοί που μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιο εύκολα στη κλινική πρακτική. Τέλος, στο τρίτο κεφάλαιο, γίνεται μια παρουσίαση των σημαντικότερων περιορισμών στη χρήση των βιοδεικτών καθώς και εξαγωγή συμπερασμάτων από τη παρούσα εργασία.

Λέξεις-κλειδιά: νόσος Alzheimer, βιοδείκτες, νευροφλεγμονή, miRNAs, β-αμυλοειδές

«Methods for the Determination of Molecular Biomarkers for Alzheimer's Disease»

«Konstantina Zygouveli»

ABSTRACT

Alzheimer's disease is a chronic neurodegenerative disorder and is the most common cause of dementia. It is estimated that it is the seventh leading cause of death in the United States in 2022 and that in 2050 the number of patients worldwide will reach 150 million. Its main clinical manifestation is the memory disorder, but other nervous functions are gradually affected, burdening the patient's social life. It is a disease that has a large social and economic cost as it is not curable and the patient needs constant supervision and care. Early diagnosis of the disease is critical in order to immediately start medication that can delay the progression of the disease and improve the patient's quality of life.

In this paper, an attempt is made to investigate the diagnostic approaches with particular emphasis on the study of biomarkers that can be used for early diagnosis, staging of the disease and monitoring the response to treatment. In the introduction, a reference is made to the structure of the brain and the way nerve impulses are transmitted. In the first chapter, reference is made to the pathophysiology and causes of the disease. In the second chapter, the most important biomarkers that have been studied as well as biomarkers that are under study are presented. Particular emphasis is placed on biomarkers detected in blood and fluids as they are the ones that can be most easily used in clinical practice. Finally, in the third chapter, there is a presentation of the most important limitations in the use of biomarkers as well as drawing conclusions from the present work.

Keywords: Alzheimer's disease, biomarkers, neuroinflammation, miRNAs, β -amyloid

Εισαγωγή

Εγκέφαλος : Δομή και Λειτουργία

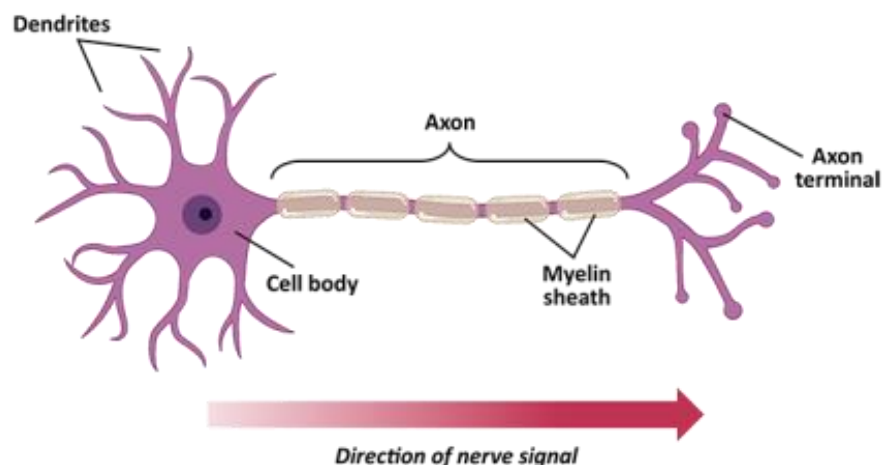
Η δομή και η μοριακή κατανόηση του ανθρώπινου νευρικού συστήματος είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Βέβαια, με βάση τις τεχνολογικές προόδους στη γονιδιωματική και στη μοντελοποίηση ιστών, υπάρχει η δυνατότητα κατανόησης της ανθρώπινης νευρικής ανάπτυξης και δυσλειτουργίας σε νευρολογικές και ψυχιατρικές ασθένειες. (Kelley & Pasca, 2022)

Τα όργανα του νευρικού συστήματος είναι ο εγκέφαλος, ο νωτιαίος μυελός και τα νεύρα τα οποία αποτελούνται από νευρικό ιστό. Ο εγκέφαλος είναι το πιο περίπλοκο και ενεργοβόρο μέρος του ανθρώπινου σώματος το οποίο λειτουργεί με γρήγορο και αυτοματοποιημένο τρόπο. Χωρίζεται σε τρία διαφορετικά μέρη, τον πρόσθιο εγκέφαλο, τον μεσεγκέφαλο και τον οπίσθιο εγκέφαλο. Ο οπίσθιος εγκέφαλος αποτελείται από το ανώτερο τμήμα του νωτιαίου μυελού, το εγκεφαλικό στέλεχος και την παρεγκεφαλίδα. Είναι υπεύθυνος για τις ζωτικές λειτουργίες του σώματος όπως είναι η αναπνοή και ο καρδιακός ρυθμός. Το ανώτερο μέρος του εγκεφαλικού στελέχους είναι ο μεσεγκέφαλος, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη λειτουργία των αντανακλαστικών. Ο πρόσθιος εγκέφαλος είναι το πιο ανεπτυγμένο μέρος του ανθρώπινου εγκεφάλου, αποτελείται από τον τελεγκέφαλο ο οποίος είναι το μεγαλύτερο μέρος του εγκεφάλου. Η επιφάνεια του εγκεφάλου και της παρεγκεφαλίδας έχει ένα ζωτικό στρώμα ιστού που ονομάζεται φλοιός στον οποίο λαμβάνει χώρα το μεγαλύτερο μέρος της επεξεργασίας των πληροφοριών.

Στον μεσεγκέφαλο βρίσκεται ο υποθάλαμος που είναι υπεύθυνος για την ρύθμιση σημαντικών λειτουργιών όπως και χημικών ουσιών που ευθύνονται για τα συναισθήματα. Αμέσως μετά είναι ο υποθάλαμος όπου πραγματοποιείται η εκκαθάριση πληροφοριών που πηγάζουν προς και από τον νωτιαίο μυελό. Στον ιππόκαμπο φτάνει μέσω του υποθάλαμου και του θαλάμου ένας αγωγός νευρικών κυττάρων, δηλαδή λειτουργεί ως δείκτης μνήμης. Αναμνήσεις μεταφέρονται στο κατάλληλο τμήμα του εγκεφαλικού ημισφαιρίου για αποθήκευση και επανέρχονται όταν απαιτείται. Ο νευρώνας είναι ένα κύτταρο το οποίο αποτελεί την βασική λειτουργική μονάδα με όλα τα σήματα αίσθησης, κίνησης, ανάμνησης και συναισθημάτων να

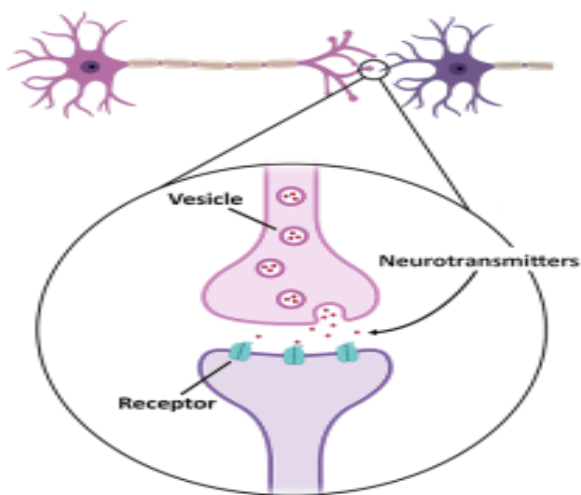
περνούν μέσα από αυτούς. Οι νευρώνες αποτελούνται από τρία μέρη: το κυτταρικό σώμα (Cell Body), τους δενδρίτες (Dendrites) και τον άξονα (Axon).

Το κυτταρικό σώμα περιέχει τον πυρήνα, οι δενδρίτες βρίσκονται έξω από το κυτταρικό σώμα και λαμβάνουν μηνύματα από άλλα νευρικά κύτταρα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματική Απεικόνιση της οδού των σημάτων από τους δενδρίτες μέσω του κυτταρικού σώματος προς έναν άξονα και σε έναν άλλο νευρώνα, κύτταρα σε κάποιο άλλο όργανο ή ένα μυϊκό κύτταρο (www.ninds.nih.gov)

Η μυελίνη (Myelin sheath) είναι ένα λιπώδες μόριο που προσφέρει μόνωση στον άξονα έτσι ώστε να είναι δυνατή η μεταβίβαση των νευρικών σημάτων. Υπάρχουν δυο τύπου αξόνων, οι μικροί και οι μεγάλοι. Οι μικροί μεταφέρουν σήματα από ένα κύτταρο του φλοιού σε ένα άλλο κύτταρο και αντίστοιχα οι μεγάλοι μεταφέρουν μηνύματα από τον εγκέφαλο μέχρι το νωτιαίο μυελό. Όταν το σήμα φτάσει στο τέλος του άξονα απελευθερώνονται μικροσκοπικοί σάκοι που ονομάζονται κυστίδια. Αυτά τα κυστίδια (Vesicles) απελευθερώνουν χημικές ουσίες γνωστές ως νευροδιαβιβαστές οι οποίοι προσκολλώνται σε υποδοχείς στο γειτονικό κύτταρο (Receptors). (Εικόνα 2)



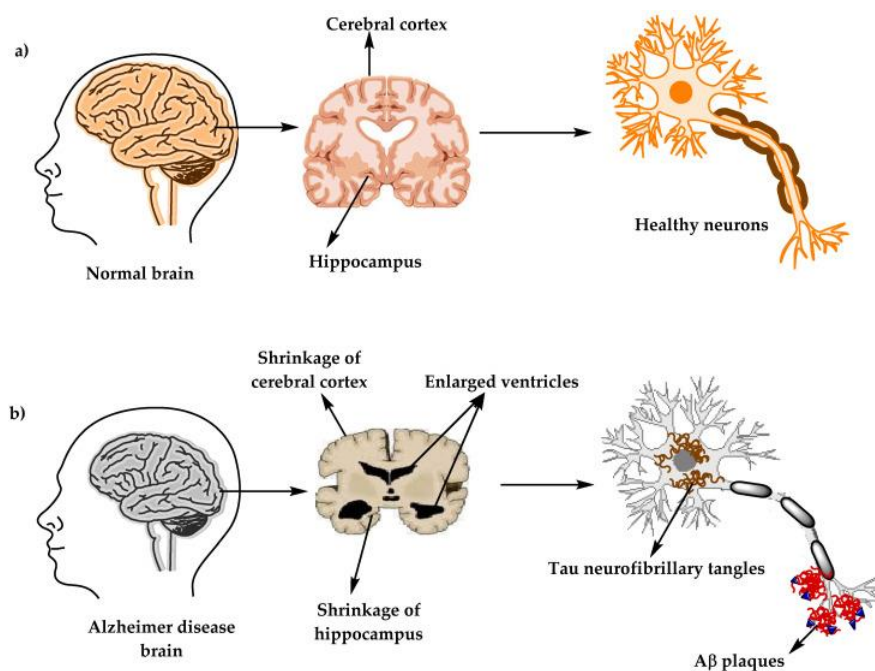
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση απελευθέρωσης χημικών ουσιών, νευροδιαβιβαστών μέσω κυστιδίων (www.ninds.nih.gov)

Η ακετυλοχολίνη, το γλουταμινικό, το GABA (γάμα-αμινοβουτυρικό οξύ), η σεροτονίνη είναι νευροδιαβιβαστές οι οποίοι μπορούν να επηρεαστούν είτε ανασταλτικά είτε διεγερτικά με αποτέλεσμα διαταραχή στη μεταβίβαση των νευρικών ερεθισμάτων και κατά συνέπεια στην εμφάνιση νευρικών ασθενειών. Όπως θα αναλυθεί στην συγκεκριμένη εργασία η Νόσος Alzheimer, σχετίζεται και με έλλειψη ακετυλοχολίνης. (www.ninds.nih.gov)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : Νόσος Alzheimer

1.1. Εισαγωγή

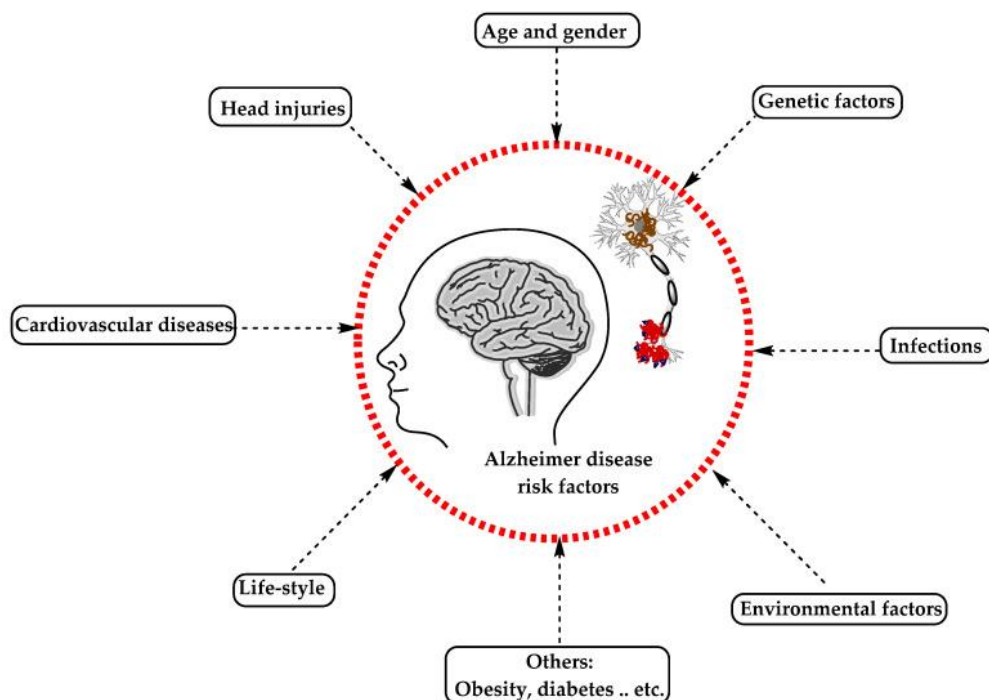
Η νόσος Alzheimer (AD) πήρε το όνομά της από τον Γερμανό ψυχίατρο Alois Alzheimer και ορίζεται ως μια νευροεκφυλιστική διαταραχή δηλαδή πρόκειται για μια ασθένεια όπου προκαλείται εκφυλισμός των κυττάρων του εγκεφάλου (Εικόνα 3). Χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση αμυλοειδών πλακών και νευροϊνιδιακών δεσμών στην πιο πληγείσα περιοχή του εγκεφάλου, τον έσω κροταφικό λοβό και τις νεοφλοιώδεις δομές. Έχει ως γενικό αποτέλεσμα την άνοια όπου αιτιολογημένα επηρεάζεται η καθημερινότητα ενός ανθρώπου που νοσεί. Μεγαλύτερο ποσοστό των παθόντων είναι άτομα άνω των 65 ετών που επηρεάζεται η μνήμη, η κατανόηση, η προσοχή, η κρίση και ο συλλογισμός. Η παρουσία της νόσου Alzheimer σε πρώιμο στάδιο είναι ασυνήθιστη σε ποσοστό έως 10%.



Εικόνα 3 : α) Φυσιολογικός εγκέφαλος και νευρώνας και β) εγκέφαλος και νευρώνας σε ασθενή (Breijyeh & Karaman, 2020)

1.1.1. Αίτια

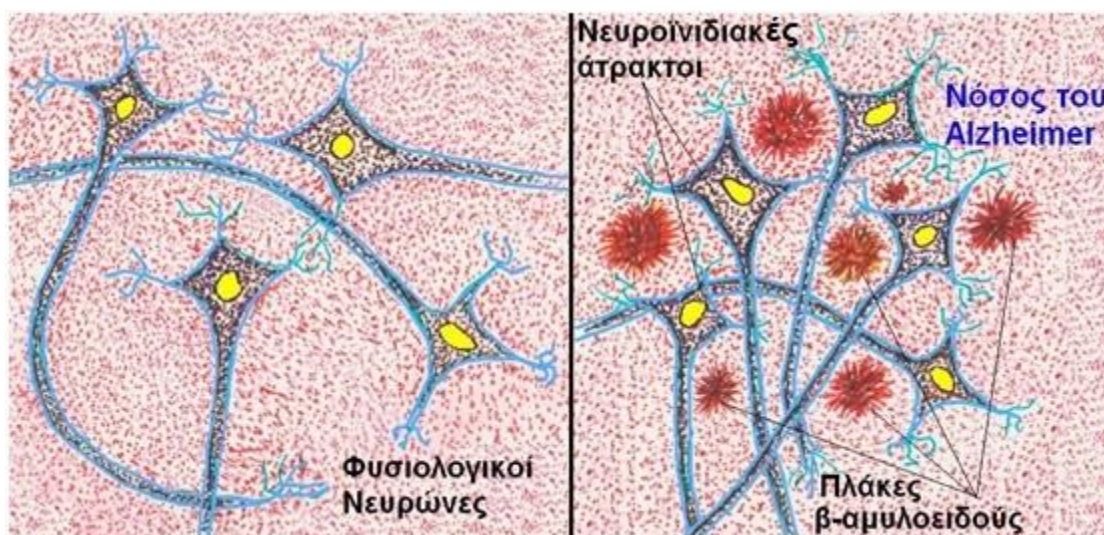
Σύμφωνα με έρευνες οι πιθανές αιτίες για τη νόσο είναι η εξασθένηση της χολινεργικής λειτουργίας και η μεταβολή στην παραγωγή β-πρωτεΐνης αμυλοειδούς που είναι και ο κύριος παράγοντας έναρξης. Όπως προαναφέρθηκε το AD είναι μια νόσος που προκαλείται από τον θάνατο νευρικών κυττάρων ο οποίος αρχίζει από τον ενδορινικό φλοιό και εισέρχεται στον ιππόκαμπο. Η τρισωμία 21 ή αλλιώς Σύνδρομο Down είναι ένας παράγοντας κινδύνου που συμβάλει στην πρόωπη έναρξη άνοιας. Παράγοντες κινδύνου πέρα της ηλικίας είναι οι γενετικοί παράγοντες (συγγενικό πρόσωπο – αύξηση εμφάνισης νόσου κατά 10% έως 30%), οι τραυματισμοί στο κεφάλι, οι αγγειακές παθήσεις, οι λοιμώξεις, η διατροφική ανεπάρκεια, η ανεπάρκεια B12, οι όγκοι, τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης, η παρουσία αλληλόμορφου APOE e4 (Απολιποπρωτεΐνη) ακόμα και περιβαλλοντικοί παράγοντες π.χ. βαρέα μέταλλα, ιχνοστοιχεία. (Tong, Wu, Li, & Cheung, 2018) (Kumar, Sidhu, Goyal, & al., 2022) (Breijyeh & Karaman, 2020) (Εικόνα 4)



Εικόνα 4 : Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της ασθένειας (Breijyeh & Karaman, 2020)

1.1.2 Παθοφυσιολογία

Η νόσος Alzheimer οφείλεται στον σχηματισμό μη φυσιολογικών νευριτικών πλακών και άμορφων νευροϊνιδίων. Η πρωτεΐνη τ , η οποία σχετίζεται με το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων και τα αμυλοειδή πεπτίδια β ($A\beta$) είναι πρωτεΐνη που εμπλέκεται παθολογικά στην νόσο. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι και η έλλειψη ασβεστίου είναι επιβαρυντικός παράγοντας για την εμφάνιση της νόσου. Οι νευριτικές πλάκες, είναι μικροσκοπικές εστίες εξωκυτταρικής εναπόθεσης αμυλοειδούς, σχετίζονται είτε με βλάβη των δενδριτών είτε των αξόνων και βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο μεταιχμιακό και το συνειρμικό φλοιό. Οι εναποθέσεις αμυλοειδούς β -πρωτεΐνης ($A\beta$) στις πλάκες αυτές εμφανίζουν χαρακτηριστική νηματοειδή μορφή κυρίως ως αστεροειδείς μάζες αμυλοειδών ινιδίων. (Εικόνα 5) (Selkoe, 2001)



Εικόνα 5 : Εναποθέσεις πλακών αμυλοειδούς (Πηγή : <https://gkelismedicallexicon.gr>)

Η APP (amyloid beta precursor protein) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που μπορεί να διασπαστεί με την δράση πρωτεασών (α , β και γ -σεκρετασών) και έτσι να σχηματιστεί το β -αμυλοειδές πεπτίδιο. Τα τμήματα που προκύπτουν από την δράση αυτών των ενζύμων δεν επηρεάζουν τη δράση των νευρώνων. Η διαδοχική πρωτεόλυση με τις β και γ σεκρετάσες οδηγεί στη δημιουργία ενός πεπτιδίου 42 αμινοξέων (β -αμυλοειδές 42). Η αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου αυτού έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση αμυλοειδούς που είναι τοξικό για τους νευρώνες. Έτσι εμφανίζεται σχηματισμός συσσωματωμένης ινδικής αμυλοειδούς πρωτεΐνης έναντι της κανονικής αποικοδόμησης της APP. Το γονίδιο APP βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21, μια από τις περιοχές που συνδέονται με την οικογενή νόσο Alzheimer. Η εναπόθεση αμυλοειδούς εμφανίζεται γύρω από τα μηνιγγικά και εγκεφαλικά αγγεία και τη φαιά ουσία. Οι εναποθέσεις φαιάς ουσίας είναι πολυεστιακές και συνενώνονται για το σχηματισμό των πλακών. Ωστόσο, έχουν βρεθεί περιπτώσεις όπου οι σαρώσεις εγκεφάλου έχουν εντοπίσει αμυλοειδείς πλάκες σε άτομα χωρίς άνοια και αντίθετα σε άτομα με άνοια δεν εντοπίστηκαν πλάκες.

Τα νευροϊνίδια είναι ενδοκυτταροπλασματικοί σχηματισμοί που εντοπίζονται σε νευρικά κύτταρα και αποτελούνται κυρίως από την πρωτεΐνη tau. Ο βασικός φυσιολογικός ρόλος της πρωτεΐνης αυτής είναι η σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων. Οι μικροσωληνίσκοι βρίσκονται σε όλο το μήκος των νευραξόνων και επιτελούν την ενδοκυτταρική μεταφορά του νευρικού ερεθίσματος. Στη νόσο AD, λόγω της συσσώρευσης του εξωκυτταρικού β -αμυλοειδούς, προκαλείται υπερφωσφορυλίωση της tau, η οποία και ευνοεί το σχηματισμό

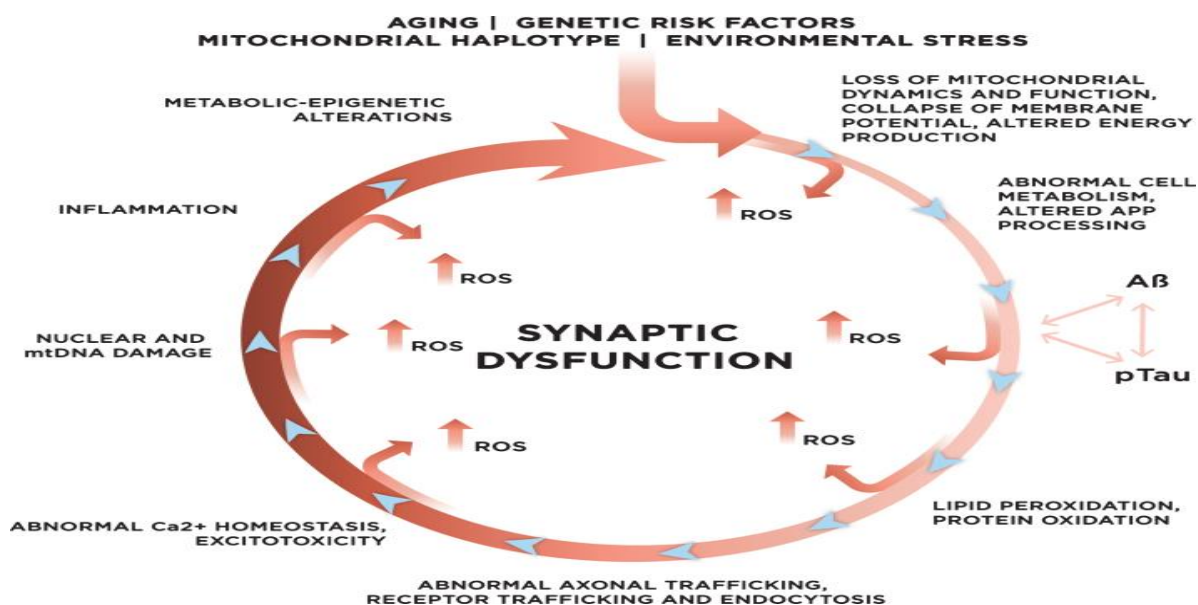
συσσωματωμάτων την πρωτεΐνης. Έτσι δημιουργούνται ελικοειδή νημάτια τα οποία χαρακτηρίζονται ως «νευροινιδικά κουβάρια» (neurofibrillary tangles). Αυτά εμφανίζονται αρχικά στον ιππόκαμπο και στη συνέχεια μπορεί να παρατηρηθούν σε όλη την έκταση του εγκεφάλου. Αυτά τα συσσωματώματα παρατηρούνται στο εσωτερικό των νευρώνων. Ο Braak και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν ένα σύστημα σταδιοποίησης της νόσου ανάλογα με την έκταση των συσσωματωμάτων αυτών. Έτσι η ασθένεια κατατάσσεται σε 6 στάδια τα οποία αποτελούν βασικό νευροπαθολογικό κριτήριο για τη διάγνωση της νόσου. Αυτά τα στάδια έχει υιοθετήσει και το National Institute on Aging and Reagan Institute για τη διάγνωση. Γενικά η εμφάνιση νευροινδιακών συσσωματωμάτων σχετίζεται πολύ πιο έντονα με τη νόσο AD από ότι οι πλάκες.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου είναι η κοκκιώδης εκφύλιση των πυραμιδικών κυττάρων του ιππόκαμπου που μπορεί να προκληθεί από αμυλοειδική αγγειοπάθεια. Σε πολλές περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι η έκπτωση στις γνωστικές λειτουργίες οφείλεται κυρίως στη μείωση των προσυναπτικών κυστιδίων σε πυραμιδικούς νευρώνες παρά σε εναπόθεση πλακών αμυλοειδούς. Αυτή η απώλεια μπορεί να οδηγήσει και σε χαμηλή συγκέντρωση ακετυλοχολίνης με αποτέλεσμα διαταραχές στη μεταβίβαση του ερεθίσματος.

Η επίδραση των αγγειακών διαταραχών στη νόσο δεν είναι εξακριβωμένη. Έτσι διαπιστωθεί ωστόσο ότι εγκεφαλοαγγειακές νόσοι αυξάνουν το κίνδυνο (μέχρι και 4 φορές) και τη σοβαρότητα της άνοιας και επιταχύνουν την εξέλιξή της.

Άλλοι παράγοντες που παίζουν ρόλο στην πρόωπη εμφάνιση της νόσου Alzheimer είναι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και το οξειδωτικό στρες. Όταν η οξειδάση του κυτοχρώματος c βρίσκεται σε χαμηλό επίπεδο υπάρχει μεγάλη πιθανότητα δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων. Επιπροσθέτως η διαπερατότητα των μιτοχονδρίων επηρεάζεται από την υπερδιέγερση της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK-3) η οποία υπερδιέγερση οφείλεται στο οξειδωτικό στρες (OS) και κατά συνέπεια σε υπερπαραγωγή ROS. Επιπλέον, η μη φυσιολογική ομοιόσταση βιοδραστικών μετάλλων όπως σίδηρος (Fe), χαλκό (Cu), ψευδάργυρος (Zn), μαγνήσιο (Mg), μαγγάνιο (Mn) και αλουμίνιο (Al) έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών και κατά συνέπεια και του οξειδωτικού στρες που επηρεάζει τη συσσώρευση Αβ και Ταυ. (Tönnies & Trushina, 2017). Η εναπόθεση πλακών Αβ έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο και κατ' επέκταση και στο κυτταρόπλασμα. Οι πλάκες Αβ μπορεί να οδηγήσουν σε υπερβολική ενεργοποίηση των υποδοχέων γλουταμινικού N-Methyl-D-aspartate (NMDARs)

με αποτέλεσμα απότομη εισροή ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, οι πλάκες μπορούν να ενεργοποιήσουν άμεσα την οξειδάση της NADPH και να προκαλέσουν απευθείας παραγωγή ελευθέρων ριζών. (Khan, Barve, & Kumar, 2020) (Kumar, Sidhu, Goyal, & al., 2022). Εικόνα 6



Εικόνα 6: Η ηλικία, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η παραγωγή ROS επιταχύνουν την κυτταρική βλάβη και δυσλειτουργία (Tönnies & Trushina, 2017)

1.1.2.1 Γενετική Βάση της Νόσου Αλτσχάιμερ

Η νόσος του Αλτσχάιμερ κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και οφείλεται σε μεταλλάξεις σε 3 γονίδια : το γονίδιο APP που εδράζεται στο χρωμόσωμα 21, το γονίδιο PSEN1 στο χρωμόσωμα 14 και το γονίδιο PSEN2 στο χρωμόσωμα 1. Οι μεταλλάξεις στο APP σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή αμυλοειδούς β πεπτιδίου ενώ οι μεταλλάξεις στα γονίδια PSEN1 και PSEN2 οδηγούν σε σχηματισμό συσσωματωμάτων β-αμυλοειδούς παρεμποδίζοντας την επεξεργασία της γάμμα-εκκρινάσης. Αυτές οι μεταλλάξεις εμφανίζονται σχεδόν στο σύνολο των περιπτώσεων πρώιμης έναρξης της ασθένειας και στο 5-10% όλων των περιπτώσεων.

Ένας άλλος παράγοντας που σχετίζεται γενετικά με την ασθένεια είναι η απολιποπρωτεΐνη E (APOE). Η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει το μεταβολισμό των λιπιδίων και εμφανίζει συγγένεια με τη πρωτεΐνη β-αμυλοειδούς. Πρόκειται για ένα γενετικό δείκτη που αυξάνει το κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας. Η ισομορφή e4 του γονιδίου APOE εδράζεται στο χρωμόσωμα 19

και σχετίζεται με πιο σποραδικές περιπτώσεις της νόσου κυρίως σε ασθενείς άνω των 65 ετών. Η παρουσία ενός αλληλομόρφου e4 δεν συνεπάγεται αναγκαστικά εμφάνιση της ασθένειας αλλά έχει διαπιστωθεί ότι το 50% των ατόμων που φέρουν ένα τέτοιο αλληλόμορφο πάσχουν από AD, ενώ όσοι έχουν δύο αλληλόμορφα πάσχουν σε ποσοστό 90%. Κάθε αλληλόμορφο e4 ελαττώνει επίσης και την ηλικία έναρξης της ασθένειας. Συμπερασματικά, η εμφάνιση e4 αλληλομόρφων είναι ένας βασικός παράγοντας κινδύνου για την ασθένεια .

Επιπλέον μεταλλάξεις του γονιδίου για τον υποδοχέα της σορτιλίνης ,SORT1, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά της διαμεμβρανικής APP από τη κυτταρική επιφάνεια στο σύμπλεγμα Golgi-ενδοπλασματικό δίκτυο έχουν εντοπιστεί σε αρκετές περιπτώσεις οικογενούς και σποραδικής μορφής της νόσου (Kumar, Sidhu, Goyal, & al., 2022) (Ge, et al., 2022) (Verma, Wills, & Chu, 2018)

1.1.3 Θεραπεία / Διαχείριση

Μέχρι και σήμερα δεν έχει βρεθεί θεραπεία για την νόσο. Η μόνη θεραπευτική προσέγγιση είναι η φαρμακευτική αγωγή για την ανακούφιση των συμπτωμάτων. Δυστυχώς η φαρμακευτική αγωγή ξεκινά μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων παρά το γεγονός ότι οι πρώτες παθολογικές αλλοιώσεις μπορεί να εμφανιστούν και 10 χρόνια πριν από τη πρώτη εκδήλωση της ασθένειας (Khan, Barve, & Kumar, 2020). Έχουν βρεθεί και εγκριθεί δυο ειδών φάρμακα για τη ανακούφιση των συμπτωμάτων και όχι τη κάθε αυτού θεραπεία της νόσου του Alzheimer τα οποία είναι οι αναστολείς της χολινεστεράσης και οι μερικοί ανταγωνιστές N-μεθυλ D-απαρτικού (NMDA). (Kumar, Sidhu, Goyal, & al., 2022)

Όσον αναφορά τους αναστολείς χολινεστεράσης είναι αναστολείς που αυξάνουν την ενδογενή δράση της ακετυλοχολίνης η οποία είναι μια χημική ουσία και είναι πολύ σημαντική για την επικοινωνία μεταξύ νευρικών κυττάρων, δηλαδή τη μάθηση, τη μνήμη κ.α.. Φάρμακα αυτής της κατηγορίας που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της νόσου είναι η ντονεπεσίλη, η ριβαστιγμίνη και η γκαλανταμίνη όπου το κάθε ένα έχει συγκεκριμένο στάδιο που χρησιμοποιείται (Εικόνα 7), ενώ υπάρχει και πληθώρα φαρμακευτικών ουσιών που δοκιμάστηκαν και δεν εγκρίθηκαν λόγω αποτυχίας των κλινικών δοκιμών (Εικόνα 8).

Name of the Drug	Company	Mechanism of Action	Clinical Trial	Symptoms to be Relieved
Brexiprazole	Otsuka & Lundbeck	D2 partial agonist	Phase III	agitation
Tetrahydrocannabinol	Johns Hopkins University	CB1/CB2 partial agonist	Phase II trials	
Nabilone	Sunnybrook Health Sciences Centre	semisynthetic cannabinoid derivative	small-scale phase III	
Pimavanserin	Acadia	selective 5-HT _{2A} serotonin inverse agonist	phase II/III	psychotic
Suvorexant	Merck	dual antagonists of the orexin receptors	Phase III	insomnia
Lemborexant	Eisai	dual antagonists of the orexin receptors	Phase II	

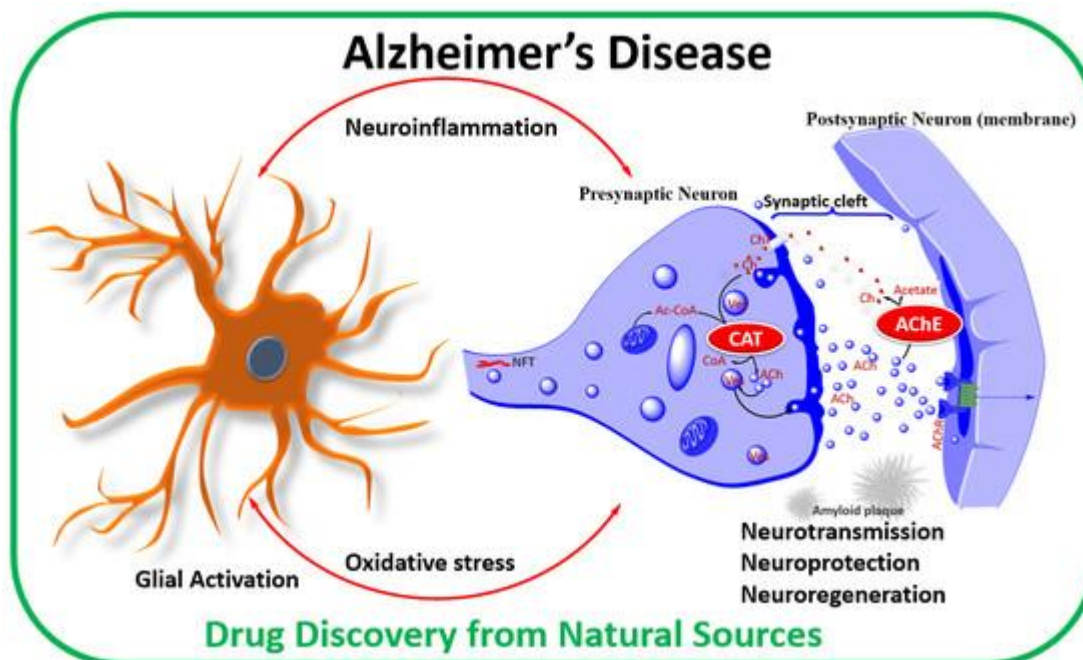
Εικόνα 7: Στον παραπάνω πίνακα απεικονίζονται τα φάρμακα τα οποία παρέχουν συμπτωματική ανακούφιση και το καθένα χρησιμοποιείται σε συγκεκριμένη φάση (Khan, Barve, & Kumar, 2020)

Name of the Drug	Company	Mechanism of Action	Clinical Trial	Reason for Failure
Verubecestat	Merck	β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE 1) inhibitors	EPOCH trial APECS trial	No effect on slowing the progression of AD
Lanabecestat	Astra Zeneca & Eli Lilly	BACE 1 inhibitors	AMARANTH and DAYBREAK-ALZ	Failure of interim futility analysis
Atabecestat	Janssen	BACE 1 inhibitors	EARLY	Liver toxicity
Solanezumab	Eli Lilly	Monoclonal antibody for AB	EXPEDITION III (Phase III)	No positive effect on cognitive decline
Azeliragon	vTv Therapeutics	Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE) inhibitor	STEADFAST (Phase III)	Lack of efficacy
Pioglitazone	Takeda and Zinfandel Pharmaceuticals	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR- γ)	-	-
Idalopirdine	Lundbeck & Otsuka	5HT ₆ antagonist	STARSHINE, STARBEAM, STARBRIGHT (Phase III)	Did not improve cognition

Εικόνα 8 : Στον παραπάνω εικόνα απεικονίζονται τα φάρμακα τα οποία δεν εγκρίθηκαν λόγω αποτυχίας κλινικών δοκιμών (Khan, Barve, & Kumar, 2020)

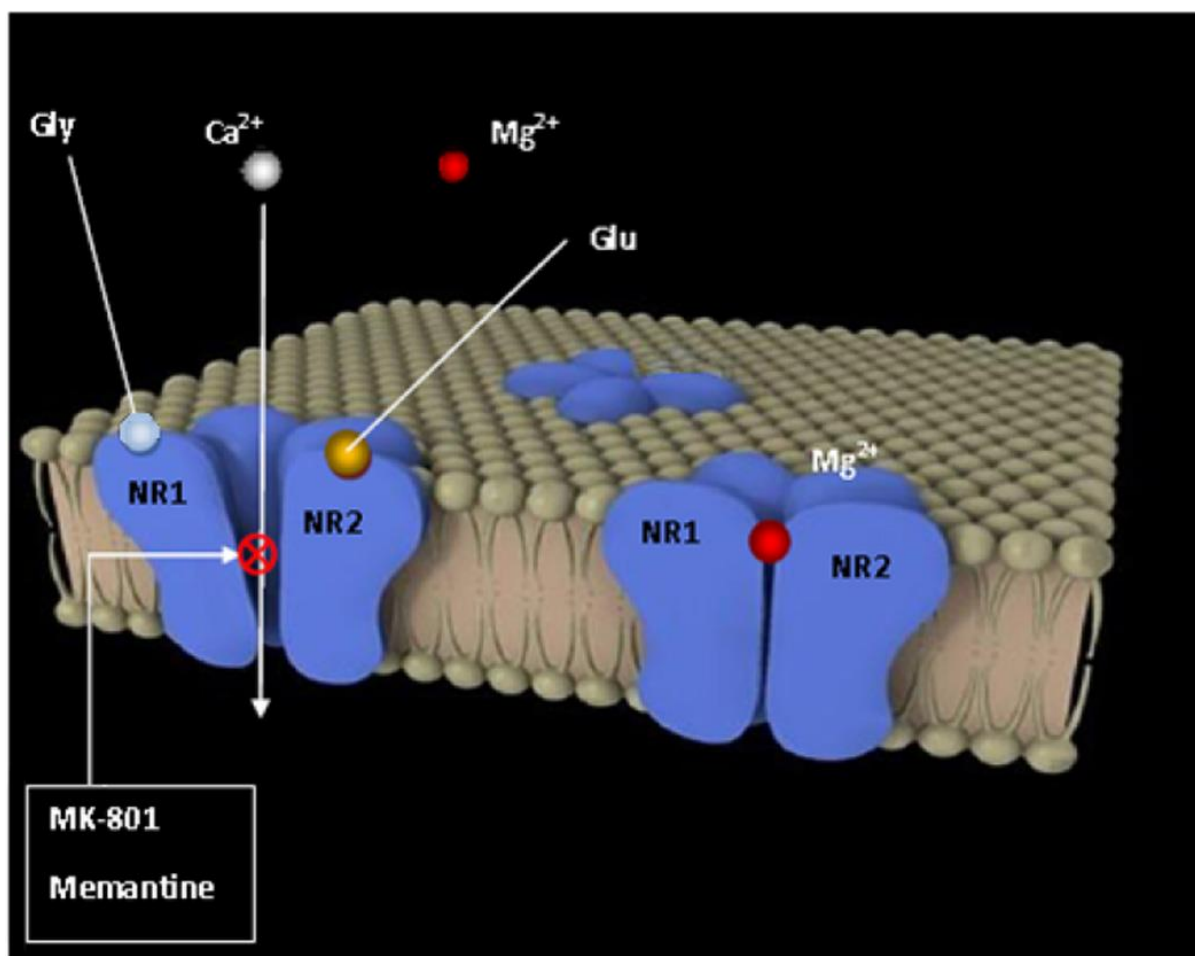
Καθώς η νόσος εξελίσσεται σε επόμενα στάδια ο εγκέφαλος παράγει μικρότερη ποσότητα ακετυλοχολίνης και με την πάροδο του χρόνου τα φάρμακα γίνονται λιγότερο αποτελεσματικά. (<https://www.nia.nih.gov>). Όπως προαναφέρθηκε το κάθε φάρμακο μπορεί να έχει αποτελεσματικότητα σε συγκεκριμένο στάδιο. Το Donepezil μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα στάδια της νόσου του Alzheimer ενώ η γκαλανταμίνη και η ριβαστιγμίνη χρησιμοποιούνται για θεραπεία σε στάδιο MCI (Mild Cognitive Impairment) δηλαδή σε στάδιο που μπορούν ακόμα να φροντίζουν τον εαυτό τους και να κάνουν τις καθημερινές δραστηριότητές τους. (<https://www.doctorhomecare.gr>). Η δονεπεξίλη και η γκαλανταμίνη είναι γρήγοροι αναστρέψιμοι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης ενώ η ριβαστιγμίνη είναι ένας αργός, αναστρέψιμος αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης και της βουτυρυλοχολινεστεράσης

(Εικόνα 9). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η γκαλανταμίνη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε νεφρική νόσο τελικού σταδίου ή σοβαρή ηπατική δυσλειτουργία. Μειονεκτήματα των αναστολέων της χολινεστεράσης είναι ότι έχουν ορισμένες παρενέργειες όπως ναυτία, έμετος και διάρροια. Οι διαταραχές ύπνου είναι πιο συχνές με τη δονεπεζίλη.



Εικόνα 9: Δράση των αναστολέων της χολινεστεράσης (Habtemariam, 2019)

Όσον αναφορά τον μερικό ανταγωνιστή N-Methyl D-aspartate (NMDA) memantine είναι υπεύθυνος για την δέσμευση των υποδοχών NMDA και επομένως μπορεί επιβραδύνει την ενδοκυτταρική συσσώρευση ασβεστίου. Τα NMDAR είναι τετραμερή σύμπλοκα και αποτελούνται από δύο υπομονάδες NR1 που σχηματίζουν το ίδιο το κανάλι και δύο υπομονάδες NR2A, NR2B, NR2C ή NR2D (Εικόνα 10). Τα χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες του καναλιού NR1 εξαρτάται από την διαμόρφωση των υπομονάδων NR2. Επίσης το συγκεκριμένο φάρμακο έχει εγκριθεί από τον FDA για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων σε μέτριο έως σοβαρό στάδιο της νόσου του Alzheimer. Η μεμαντίνη ρυθμίζει το γλουταμικό η οποία είναι μια σημαντική χημική ουσία του εγκεφάλου. Όταν το γλουταμικό παραχθεί σε ποσότητες μεγάλες μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο των εγκεφαλικών κυττάρων. Επειδή οι ανταγωνιστές NMDA λειτουργούν διαφορετικά από τους αναστολείς της χολινεστεράσης, οι δύο τύποι φαρμάκων μπορούν να λαμβάνονται σε συνδυασμό. (<https://www.nia.nih.gov>)



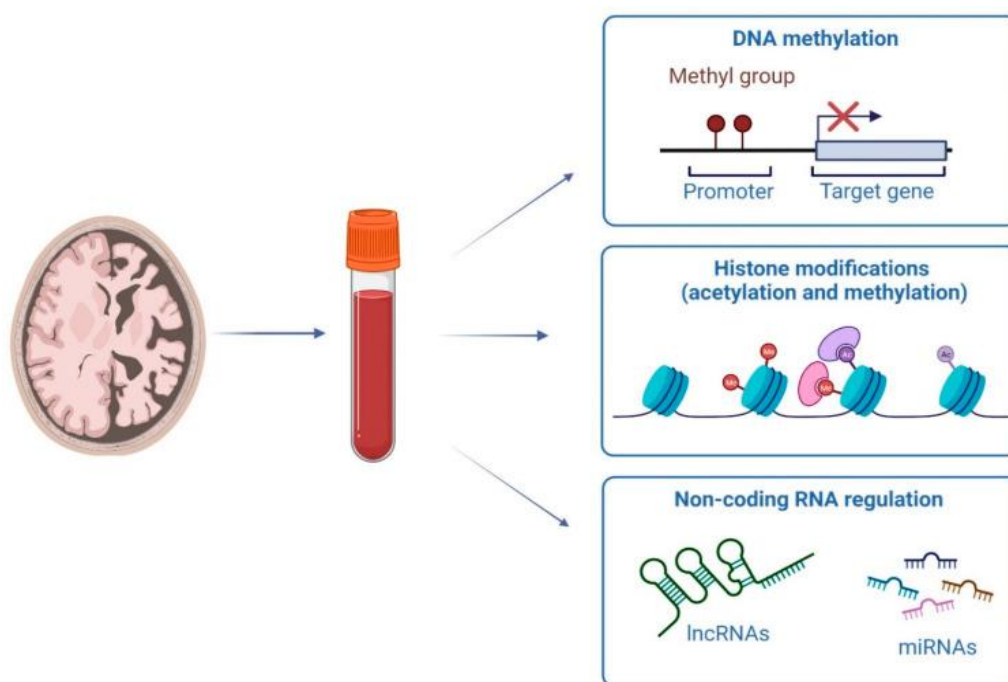
Εικόνα 10: NMDAR σε ηρεμία (δεξιά) και ενεργοποιημένο (αριστερά) μετά από δέσμευση γλυκίνης και γλουταμικού, καταστέλλοντας τον αποκλεισμό των καναλιών μαγνησίου, όπου οι ανταγωνιστές MK-801 και μεμαντίνη έχουν την αλλοστερική θέση δέσμευσης. (Oliveras D, 2012)

Είναι επίσης σημαντικό να θεραπεύεται το άγχος, η κατάθλιψη και η ψύχωση, η οποία συχνά εντοπίζεται στα μέσα έως τα τελευταία στάδια της νόσου του Αλτσχάιμερ. Τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά θα πρέπει να αποφεύγονται λόγω της αντιχολινεργικής τους δράσης. Τα αντιψυχωσικά πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο για οξεία διέγερση και μόνο εάν ο ασθενής ή ο φροντιστής έχουν εξαντληθεί. Ωστόσο, τα περιορισμένα οφέλη τους θα πρέπει να αντισταθμίζονται έναντι του μικρού κινδύνου εγκεφαλικού και θανάτου. (Khan, Barve, & Kumar, 2020) (Kumar, Sidhu, Goyal, & al., 2022)

Κεφάλαιο 2 : Διαγνωστικές προσεγγίσεις της νόσου

2.1. Εισαγωγή

Το 2011, από το Εθνικό Ινστιτούτο για τη Γήρανση και το Ερευνητικό Πλαίσιο του Συνδέσμου Alzheimer προτάθηκαν εξετάσεις για τα προκλινικά, ήπια στάδια γνωστικής εξασθένησης και άνοιας της νόσου του Alzheimer. Υπάρχει μια σειρά μεθόδων και εργαλείων που ακολουθούνται από τους ειδικούς για την διάγνωση της ασθένειας Alzheimer. (Jack, και συν., 2018). Η διάγνωση της νόσου Alzheimer βασίζεται κυρίως στην κλινική εξέταση όπου γίνεται ανίχνευση των επιπέδων πρωτεΐνης Αβ, φωσφορυλιωμένης (p-tau) και ολικής tau (t-tau) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) ασθενών συνήθως σε συνδυασμό με τεχνικές νευροαπεικόνισης όπως τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) και ογκομετρική μαγνητική τομογραφία (MRI). Επιπλέον μπορεί να γίνει διάγνωση στο αίμα των ασθενών των επιγενετικών αλλοιώσεων με προσβάσιμους βιοδείκτες για τη νόσο. Παρακάτω θα επιχειρηθεί ανάλυση των επιγενετικών βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται για την έγκαιρη διάγνωση της νόσου, όπου υπάρχει μεγάλο πλεονέκτημα όσον αφορά τη διαγνωστική ακρίβεια, τις προγνωστικές εκτιμήσεις και την παρακολούθηση της πιθανής ανταπόκρισης στις θεραπείες (Εικόνα 11). Αυτοί οι βιοδείκτες στοχεύουν στη μοριακή ανάλυση και στην υιοθέτηση κατάλληλης φαρμακευτικής ή μη φαρμακολογικής θεραπείας ικανής να αποτρέψει ή να επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου. (Villa & Stoccoro, 2022). Στη συνέχεια θα αναλυθούν οι πιθανοί βιοδείκτες που ανιχνεύονται στο αίμα ή σε διάφορα υγρά καθώς και οφθαλμικοί βιοδείκτες που είναι πολλά υποσχόμενοι για την έγκαιρη ανίχνευση και διάγνωση της νόσου.



Εικόνα 11: Έγκαιρη διάγνωση της νόσου Alzheimer με επιγενετικές τροποποιήσεις χωρίς να επηρεάζεται η αλληλουχία του DNA. (Villa & Stoccoro, 2022)

2.2 Επιγενετικοί μηχανισμοί ως βιοδείκτες

Οι κυριότεροι επιγενετικοί μηχανισμοί για την πρόωπη διάγνωση της νόσου Alzheimer είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις ιστόνης και η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης που πραγματοποιείται από μη κωδικοποιητικό RNA (ncRNA) όπως φαίνεται στην Εικόνα 11. Τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιούνται για την μεθυλίωση του DNA ονομάζονται μεθυλτρανσφεράσες DNA (DNMTs). Οι μεθυλτρανσφεράσες προσθέτουν μια μεθυλική ομάδα σε ένα υπόλειμμα κυτοσίνης δηλαδή στο πλαίσιο δινουκλεοτιδίου CpG και σχηματίζεται έτσι 5-μεθυλοκυτοσίνη (5-mC). Όταν αυτό το πλαίσιο μεθυλιώνεται, η έκφραση αυτού του γονιδίου συνήθως καταστέλλεται. Όσον αφορά τις τροποποιήσεις των ιστονών ορίζεται συνήθως από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των N-τελικών ουρών των πρωτεϊνών ιστόνης, συμπεριλαμβανομένης της ακετυλίωσης, της μεθυλίωσης, της φωσφορυλίωσης, της ουβικουιτίνης και της ριβοζυλίωσης ADP, όπου με αυτήν την τροποποίηση επηρεάζεται η δομή της χρωματίνης, προκαλώντας καταστολή της έκφρασης γονιδίων, ή μια ευχρωματική κατάσταση, που χαρακτηρίζεται από χαλαρή χρωματίνη που διευκολύνει τη γονιδιακή μεταγραφή. Τα ncRNAs, τα microRNAs και το μη κωδικοποιητικό RNA είναι μόρια RNA τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αλλά ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Το 1995 μέσω μιας έρευνας ανακαλύφθηκε ότι τα επίπεδα της μεθυλίωσης στην περιοχή του υποκινητή της APP (amyloid beta precursor protein) είναι χαμηλότερα σε ασθενείς που νοσούν σε σχέση με τα υγιή άτομα (Villa & Stocco, 2022). Η παραπάνω μελέτη πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση Southern-blot όπου το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι η υπομεθυλίωση του γονιδίου APP είναι επίσης ένας από τους λόγους που συμβάλλει στην ανώμαλη έκφραση γονιδίου στη νόσο του Alzheimer. (West, Lee, & Maroun, 1995). Το 2017 πραγματοποιήθηκαν δύο μελέτες που επιβεβαίωσαν ότι η περιφερειακή μεθυλίωση του BDNF μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως πρώιμος βιοδείκτης της νόσου Alzheimer. Η μέθοδος που εφαρμόζεται πιο συχνά για την ανίχνευση της έκφρασης ncRNA είναι η PCR πραγματικού χρόνου.

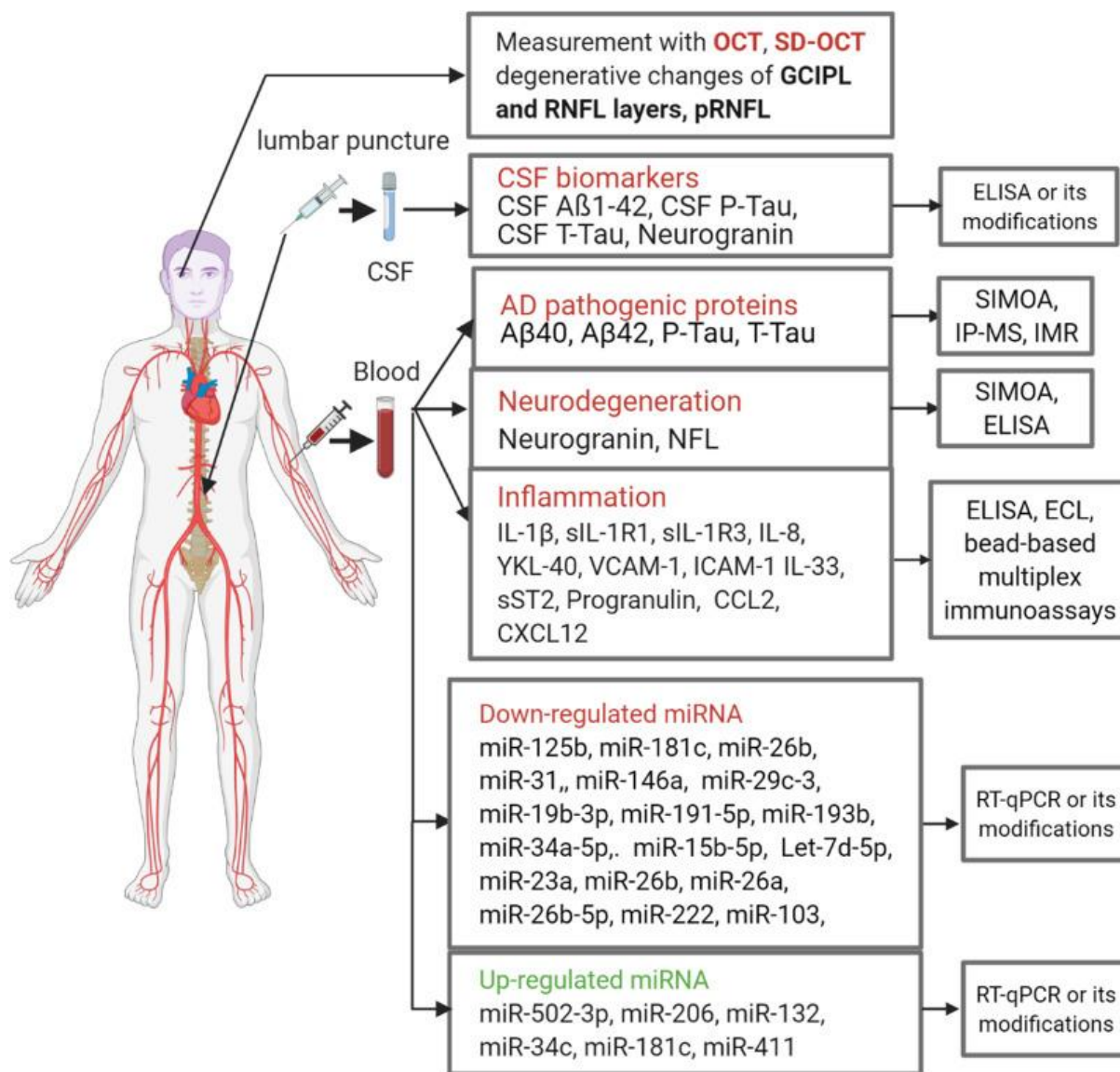
Συμπερασματικά, η μελέτη της μεθυλίωσης πολλών γονιδίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πολλά υποσχόμενος επιγενετικός βιοδείκτης για τα στάδια της νόσου. Για παράδειγμα η μεθυλίωση του γονιδίου PM20D1 (καταλύει τη βιοσύνθεση των N-λιπαρών ακυλ αμινοξέων από ελεύθερα λιπαρά οξέα και ελεύθερα αμινοξέα) είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στην εξέλιξη της νόσου. Η υποέκφραση του γονιδίου αυξάνει την εναπόθεση των πλακών αμυλοειδούς.

Επίσης το γονίδιο BIN1 εμφανίζει αλλοιώσεις στη μεθυλίωσή του σε ασθενείς με υποκειμενική γνωστική έκπτωση (SCD), ένα στάδιο μεταξύ της MCI και της AD. Αυτό υποδεικνύει ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης μεταβάλλονται κατά την εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης του BIN1 σχετίζονται με τα επίπεδα p-tau (φωσφορυλιωμένης) και t-tau (ολικής) στο ENY και επομένως ο βιοδείκτης αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη παρακολούθηση της εξέλιξης του νευροεκφυλισμού. Για τον προσδιορισμό του προτύπου μεθυλίωσης αρχικά γίνεται κατεργασία του δείγματος με όξινο θειώδες νάτριο, το οποίο προκαλεί απαμίνωση των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών και μετατροπή τους σε ουρακίλες, ενώ οι 5-μεθυλοκυτοσίνες είναι προστατευμένες και δεν μετατρέπονται. Μετά από αυτή την επεξεργασία μπορεί να χρησιμοποιηθούν διάφορες τεχνικές για το προσδιορισμό της μεθυλίωσης οι οποίες εξαρτώνται κυρίως από τα τμήματα του DNA που πρέπει να αναλυθούν. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι η MSP (methylation specific PCR) που χρησιμοποιεί ειδικούς εκκινητές σχετικούς με τις μεθυλιωμένες περιοχές και η PCR που χρησιμοποιεί εκκινητές ανεξάρτητους από τη μεθυλίωση. Οι τελευταίες συνήθως συνδυάζονται με τεχνικές πυροαλληλούχισης που είναι η τεχνική χρυσού προτύπου για τη γονιδιακή μεθυλίωση, η αλληλούχιση διθειώδους και η τεχνική τήξης υψηλής ανάλυσης ευαίσθητη στη μεθυλίωση (MS-HRM). Το DNA που έχει επεξεργαστεί με διθειώδες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το προσδιορισμό της μεθυλίωσης σε όλο το DNA είτε μέσω αλληλούχισης διθειώδους ολικού γονιδιώματος (WGBS) είτε με τη βοήθεια μικροσυστοιχιών όπως η μικροσυστοιχία Illumina BeadChip που μπορεί να καλύψει 27.578 (27 K), ~ 450.000 (450 K), ή στη πιο σύγχρονη έκδοσή της, ~850.000 (συστοιχία EPIC) τοποθεσίες CpG. Μέσω τέτοιων προσεγγίσεων μπορούν να ανιχνευτούν διαφορετικά μεθυλιωμένες θέσεις (DMP), δηλαδή θέσεις CpG που έχουν διαφορετικά μοτίβα μεθυλίωσης DNA μεταξύ πολλαπλών δειγμάτων. Από τις μελέτες αυτές βρέθηκαν ότι σε διαφορετικά στάδια της νόσου παρατηρούνται διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης σε διάφορα γονίδια και επομένως ο προσδιορισμός της μεθυλίωσης μπορεί να βοηθήσει στη σταδιοποίηση της νόσου. Για τα ncRNAs, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για τη χρήση τους ως βιοδείκτες στην AD (Villa & Stocco, 2022)

2.3. Βιοδείκτες

Οι βιοδείκτες που εξετάζονται για την ανίχνευση της νόσου κατατάσσονται σε τρεις βασικές κατηγορίες (Εικόνα 12): (α) διαγνωστικοί βιοδείκτες (απεικόνιση PET και ανάλυση εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) για Αβ και Tau, (b) δείκτες αίματος όπου γίνεται ανάλυση

πρωτεϊνών ή και miRNA στο πλήρες αίμα, στο πλάσμα ή στον ορό και (c) οφθαλμικοί δείκτες που ανιχνεύουν αλλαγές στον αμφιβληστροειδή των ασθενών και προσδιορίζονται με το λιγότερο επεμβατικό τρόπο. (Klyucherev, et al., 2022)



Εικόνα 12 : Ταξινόμηση βιοδεικτών AD ανάλογα με τη μέθοδο και το υγρό εξέτασης (Klyucherev, και συν., 2022)

2.3.1. Διαγνωστικοί βιοδείκτες

Σήμερα υπάρχουν πολλά διαγνωστικά εργαλεία για την ανίχνευση της ασθένειας όπως είναι η τεχνική απεικόνισης δομικού μαγνητικού συντονισμού (MRI), η οποία απεικονίζει το βαθμό ατροφίας του εγκεφάλου, η ^{18}F -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (^{18}F FDG) PET η οποία αξιολογεί το μεταβολισμό του εγκεφάλου, η PET αμυλοειδούς που οδηγεί σε ποσοτική

ανάλυση των εναποθέσεων πλακών Αβ και η Tau-PET [18F] με την οποία μετρούνται παθολογικοί βιοδείκτες Tau και ENY (Jack, et al., 2018). Οι διάφορες τεχνικές απεικόνισης αμυλοειδούς εμφανίζουν πάνω από 90% ευαισθησία και ειδικότητα ενώ παρατηρούνται μικρές μόνο διαφορές ανάλογα με το είδος του ραδιενεργού μορίου που χρησιμοποιείται. Επιπλέον η Tau PET είναι διαγνωστικά πιο ακριβής σε σύγκριση με τις τεχνικές MRI ενώ παρουσιάζει και υψηλή επιλεκτικότητα στη διάκριση της ασθένειας Alzheimer από άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους. (Ossenkoppele & Hansson, 2021). Οι τεχνικές PET είναι πολύ σημαντικές γιατί η εγκεφαλική αμυλοειδοπάθεια που αποκαλύπτεται μπορεί να είναι αρκετά χρόνια νωρίτερα από την έναρξη της ασθένειας και έτσι οι ασυμπτωματικοί ασθενείς κατατάσσονται σε ομάδες υψηλού κινδύνου για την εκδήλωση σοβαρής ασθένειας (Klyucherev, και συν., 2022)

Οι βιοδείκτες του εγκεφαλονωτιαίου υγρού όπως το ENY Αβ1-42, το υπερφωσφορυλιωμένο πεπτιδίο Tau (P-Tau) και η ολική πρωτεΐνη Tau (T-Tau) μπορούν να διαγιγνώσκουν την ασθένεια με ακρίβεια που είναι μεγαλύτερη του 90% ιδίως όταν χρησιμοποιούνται συνδυαστικά. Επιπλέον μπορούν να ανιχνεύσουν αλλαγές νωρίτερα από τις αλλοιώσεις που ανιχνεύονται με τις PET γεγονός με υψηλή διαγνωστική αξία (Palmqvist, et al., 2017). Ωστόσο οι τεχνικές αυτές δεν χρησιμοποιούνται ευρέως καθώς οι αναλύσεις ENY είναι επεμβατικές ενώ οι PET έχουν υψηλό κόστος. Οι αναλύσεις ENY απαιτούν οσφυονωτιαία παρακέντηση που για πολλούς ασθενείς είναι επώδυνη και τα αποτελέσματα λαμβάνονται μετά από αρκετές εβδομάδες καθώς απαιτούνται εξειδικευμένα εργαστήρια. Για τους παραπάνω λόγους οι τεχνικές αυτές είναι δύσκολο να εφαρμοστούν για προσυμπτωματικό έλεγχο του πληθυσμού και χρησιμοποιούνται μόνο στα πλαίσια κλινικών δοκιμών. Επομένως είναι επιτακτική η ανάγκη για σύγχρονες, αξιόπιστες, μικρού κόστους και λιγότερο επεμβατικών μεθόδων για την ανίχνευση, τη διάγνωση της ασθένειας και τη διάκρισή της από άλλες νευροεκφυλιστικές παθήσεις όπως η μετωποκροταφική άνοια ή η αγγειακή άνοια. Στη προσπάθεια αυτή βασικό ρόλο παίζει η ανάπτυξη βιοδεικτών στο αίμα και στα υγρά που μπορούν να ικανοποιούν τις παραπάνω προϋποθέσεις (Klyucherev, και συν., 2022)

2.3.2. Βιοδείκτες αίματος και υγρών

Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται πρωτεϊνικοί βιοδείκτες οι οποίοι μπορεί να ανιχνεύονται στο αίμα ή σε υγρά όπως για παράδειγμα η ανίχνευση του Tau στο πλάσμα. Η αιμοληψία για την ανάλυση του αίματος εμφανίζει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα, χωρίς να απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό ή εγκαταστάσεις και έτσι μπορεί να ενταχθεί στη πρωτοβάθμια περίθαλψη. Αυτό θα μπορούσε να είναι το πρώτο στάδιο μιας διαδικασίας,

όπου τυχόν ευρήματα από τη μονάδα πρωτοβάθμιας περίθαλψης θα μπορούσαν να προωθηθούν για περαιτέρω αξιολόγηση με ανάλυση ENY, μαγνητική τομογραφία ή PET. (O'Bryant, et al., 2017)

Μια άλλη κατηγορία δυνητικά χρήσιμων βιοδεικτών που ανιχνεύονται στο αίμα είναι τα miRNAs που έχουν εντοπιστεί τόσο στο πλάσμα και στον ορό όσο και στο ENY. Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτά τα miRNAs είναι χρήσιμοι βιοδείκτες για ασθένειες όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, κακοήθειες και νόσους του νευρικού συστήματος (Silvestro, Bramanti, & Mazzon, 2019). Επιπλέον μελέτες δείχνουν ότι το 50% των miRNAs εκφράζονται στο νευρικό σύστημα και είναι βασικοί ρυθμιστές της φυσιολογικής εγκεφαλικής λειτουργίας, της κυτταρικής γήρανσης ενώ διαδραματίζουν ρόλο και στην εμφάνιση ψυχικών ασθενειών (Maffioletti, Tardito, Gennarelli, & Bocchio-Chiavetto, 2014)

2.3.2.1 Βιοδείκτες με βάση το αίμα

- B-Αμυλοειδές (Αβ) στο πλάσμα

Το β-αμυλοειδές (Αβ) στη νόσο του Alzheimer χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό πολυμορφικών εναποθέσεων που περιλαμβάνουν διάχυτες και σκληρές πλάκες. Το β-αμυλοειδές (Αβ) είναι το κύριο συστατικό των αδιάλυτων πρωτεϊνικών εγκλεισμάτων και εμφανίζεται με δυο διαφορετικές μορφές: το Αβ1-42 που εντοπίζεται στα διάχυτα συσσωματώματα αμυλοειδούς και το Αβ1-40 που αποτελεί το βασικό συστατικό των αδιάλυτων ώριμων πλακών (Michno, et al., 2019). Το β-αμυλοειδές (Αβ) το οποίο εντοπίζεται στο πλάσμα έχει βρεθεί ότι είναι μια γρήγορη και οικονομική ανάλυση για εντοπισμό της νόσου Alzheimer σε αντίθεση με δείκτες που εντοπίζονται στο ENY (Palmqvist, και συν., 2017). Η παραπάνω ανάλυση δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κλινικές εφαρμογές γιατί υπάρχουν πολύ σημαντικές διαφορές στις μετρήσεις των Αβ42 και Αβ40 στο πλάσμα του αίματος από τις αντίστοιχες μετρήσεις στο ENY του ασθενή. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το β-αμυλοειδές ενώνεται με πρωτεΐνες του πλάσματος με αποτέλεσμα οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον ανοσοπροσδιορισμό στο πλάσμα όπως η ELISA, η ανοσοπροσρόφηση κ.α. να δίνουν ψευδή αποτελέσματα. Επιπλέον το β-αμυλοειδές που κυκλοφορεί στο πλάσμα μπορεί να προέρχεται και από περιφερικούς ιστούς όπως τα αιμοπετάλια, οι ινοβλάστες του δέρματος και οι σκελετικοί μύες καθιστώντας ακόμη πιο προβληματική τη συγκεκριμένη μέτρηση (Nakamura, et al., 2018).

Ένα ακόμη μειονέκτημα είναι οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις των Αβ40 και Αβ42 στο πλάσμα των ασθενών σε σχέση με το ΕΝΥ. Ωστόσο υπάρχουν ευαίσθητες μέθοδοι για το προσδιορισμό όπως η ανάλυση μονομοριακής μάζας (SIMOA) , η τεχνική ανοσομαγνητικής αναγωγής (immunomagnetic reduction, IMR) καθώς και η τεχνική ανοσοκατακρήμνισης – φασματοφωτομετρίας μάζας (IP-MS) που μπορούν να προσδιορίσουν συγκεντρώσεις μέχρι και υποπικογραμμάρια ανά χιλιοστό (όριο ποσοτικού προσδιορισμού, 0,04 pg/ml). Πιο συγκεκριμένα για τη μέτρηση της Αβ42 σε δείγματα ορού ασθενών χρησιμοποιήθηκε μια νέα δοκιμασία SiMoA Αβ42. Η τεχνική είναι μια δοκιμασία ELISA με τη χρήση παραμαγνητικών σφαιριδίων καθώς και συστοιχίες φρεατίων μεγέθους φεμτολίτρου. Τα φρεάτια είχαν διάμετρο 4,5 μm, και βάθος 3,5 μm. Οι συστοιχίες τοποθετήθηκαν σε γραμμικές ομάδες των οκτώ μέσα σε γυάλινες θήκες, σε τέτοια απόσταση ώστε να αντιστοιχούν στις στήλες των φρεατίων της πλάκας μικροτιτλοδότησης που χρησίμευαν ως λεκάνες έκπλυσης μετά τη φόρτωση σφαιριδίων. Οι επώσεις δειγμάτων και η επισήμανση ανοσοσυμπλεγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε τρία στάδια, ξεκινώντας με τη δέσμευση της αναλυόμενης ουσίας, την επώαση με βιοτινυλιωμένο ανιχνευτή και την επισήμανση με SβG. Τα σφαιρίδια από την ELISA φορτώθηκαν σε μικροφρεάτια με φυγοκέντρωση στα 1.300 g για 10 λεπτά. Τα φρεάτια που περιείχαν σφαιρίδια με επισημασμένο Αβ42 έγιναν ορατά με την υδρόλυση του υποστρώματος ενζύμου (ρεζορουφίνη β-D-γαλακτοπυρανοσίδη, RGP, Invitrogen) από βG σε φθορίζον προϊόν. Τα φρεάτια που περιέχουν ένζυμο απεικονίστηκαν με μικροσκόπιο φθορισμού εξοπλισμένο με κάμερα CCD. Στη συνέχεια έγινε η ανάλυση των εικόνων ώστε να προσδιοριστεί ο μέσος αριθμός επισημασμένου ενζύμου ανά σφαιρίδιο. Η συγκεκριμένη τεχνική δίνει πολύ μεγάλη ακρίβεια στη μέτρηση της συγκέντρωσης της Αβ42 καθώς η επίδραση από τις πρωτεΐνες του πλάσματος φαίνεται να χάνεται όταν η αραιώση του δείγματος είναι μεγαλύτερη από 1:4 πριν τη μέτρηση. Επιπλέον το γεγονός ότι η τεχνική έχει υψηλή ευαισθησία έχει ως αποτέλεσμα να μη χάνεται η ικανότητα της μεθόδου να μετράει ακόμη και πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Μια τέτοια εξαιρετικά ακριβής και ειδική ανάλυση για τη μέτρηση του Αβ42 στο αίμα είναι κομβικής σημασίας για τη μελέτη των παθογενετικών μηχανισμών της ασθένειας αλλά και την επίδραση διαφόρων θεραπευτικών προσεγγίσεων στο μεταβολισμό της Αβ (Zetterberg, et al., 2011).

Τόσο οι τεχνική SIMOA όσο και η IMR που αναπτύσσεται παρακάτω έχουν σχεδιαστεί για να αυξήσουν την ευαισθησία των ανοσοδοκιμασιών και έτσι έχουν χρησιμοποιηθεί για το ποσοτικό προσδιορισμό του Αβ και της tau στο πλάσμα σε ανθρώπους.

Με τη τεχνική IMR γίνεται ποσοτικοποίηση των αναλυτών σε ένα δείγμα μετρώντας το ποσοστό μείωσης του μαγνητικού σήματος αφού πρώτα σχηματιστεί ανοσοσύμπλοκο στην επιφάνεια μαγνητικών νανοσφαιριδίων. Το πρωτόκολλο IMR περιλαμβάνει μαγνητικά νανοσωματίδια στα οποία βρίσκονται δεσμευμένα αντισώματα. Αυτά τα νανοσωματίδια σχηματίζουν ομογενές εναιώρημα σε ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα φωσφορικών (PBS). Κάτω από την επίδραση εξωτερικών μαγνητικών πεδίων εναλλασσόμενου ρεύματος (ac), τα νανοσφαιρίδια ταλαντώνονται και παράγουν ένα εναλλασσόμενο μαγνητικό σήμα. Αν τα μαγνητικά νανοσφαιρίδια ενωθούν με την αναλυόμενη ουσία, τότε εμφανίζεται μείωση του μαγνητικού σήματος. Στην συνέχεια γίνεται ποσοτικοποίηση της μείωσης του σήματος και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας (Lee, et al., 2022)

Τα αντιδραστήρια IMR της εταιρείας MagOu απαρτίζονται από μαγνητικά νανοσφαιρίδια διαμέτρου 50-60nm, που είναι συζευγμένα με αντισώματα σε συγκέντρωση 10^9 σφαιριδίων ανά χιλιοστόλιτρο. Τα συζευγμένα αντισώματα είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της tau που αναγνωρίζει 6 ισομορφές, ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού για το προσδιορισμό της Αβ42 και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού ως αντίσωμα σύλληψης Αβ40. Ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι τα δείγματα δεν χρειάζονται έκπλυση. Τα αντιδραστήρια αναμειγνύεται με το δείγμα με καθορισμένη αναλογία όγκου. Τα δείγματα δεν είναι προ-αραιωμένα, ο συνολικός όγκος για κάθε διαδικασία είναι 120 μ l και ο συνολικός χρόνος της αντίδρασης είναι 5 ώρες. Η εταιρεία έχει αναπτύξει ένα ανοσομαγνητικό αναλυτή 36 καναλιών που βασίζεται σε SQUID (superconducting quantum interference device) (Model Xac-Pro-S) (Lue, Guerra, & Walker, 2017)

Μελέτες που χρησιμοποιούν την τεχνολογία IMR για το προσδιορισμό του Αβ και της tau έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως στη Ταϊβάν. Αυτές οι μελέτες έχουν δείξει αυξημένες συγκεντρώσεις Αβ42, μειωμένα ή παραπλήσια επίπεδα Αβ40 και αυξημένα επίπεδα tau σε ασθενείς με AD σε σύγκριση με τους υγιείς συμμετέχοντες. Οι αναλύσεις των μετρήσεων έδειξαν ότι η τεχνική παρουσίαζε ευαισθησία 96% και ειδικότητα 97% για τη διάκριση μεταξύ των υγιών μαρτύρων από μια ετερογενή ομάδα ασθενών που περιλάμβανε άτομα από ήπια γνωστική εξασθένηση μέχρι και άτομα με σοβαρή AD. Επιπλέον η τεχνική εμφάνισε ευαισθησία 80% και ειδικότητα 82% για τη διάκριση ασθενών με ήπια γνωστική εξασθένηση από ασθενείς με AD. Όταν η τεχνική συνδυάστηκε και με απεικόνιση αμυλοειδούς PET, η ευαισθησία κυμάνθηκε σε 84% και η ειδικότητα 100% για την ανίχνευση της ασθένειας. (Lue, Guerra, & Walker, 2017).

Μια άλλη σημαντική τεχνική που αναπτύχθηκε πρόσφατα είναι η δοκιμή ανοσοκατακρήμνισης και φασματομετρίας μάζας (IP-MS) για το ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων βιοδεικτών του πλάσματος. Οι μέθοδοι IP-MS είναι πολύ αξιόπιστες για το ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών και ειδικά για το Αβ και τη tau στο πλάσμα. Σε πολλές περιπτώσεις η παραπάνω τεχνική συνδυάζεται και με υγρή χρωματογραφία έτσι ώστε να επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ακρίβεια. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την ανωτερότητα της τεχνικής σε σχέση με άλλες μεθόδους π.χ. ELISA στο προσδιορισμό ειδών Αβ και p-tau. (Janelidze, et al., 2021)

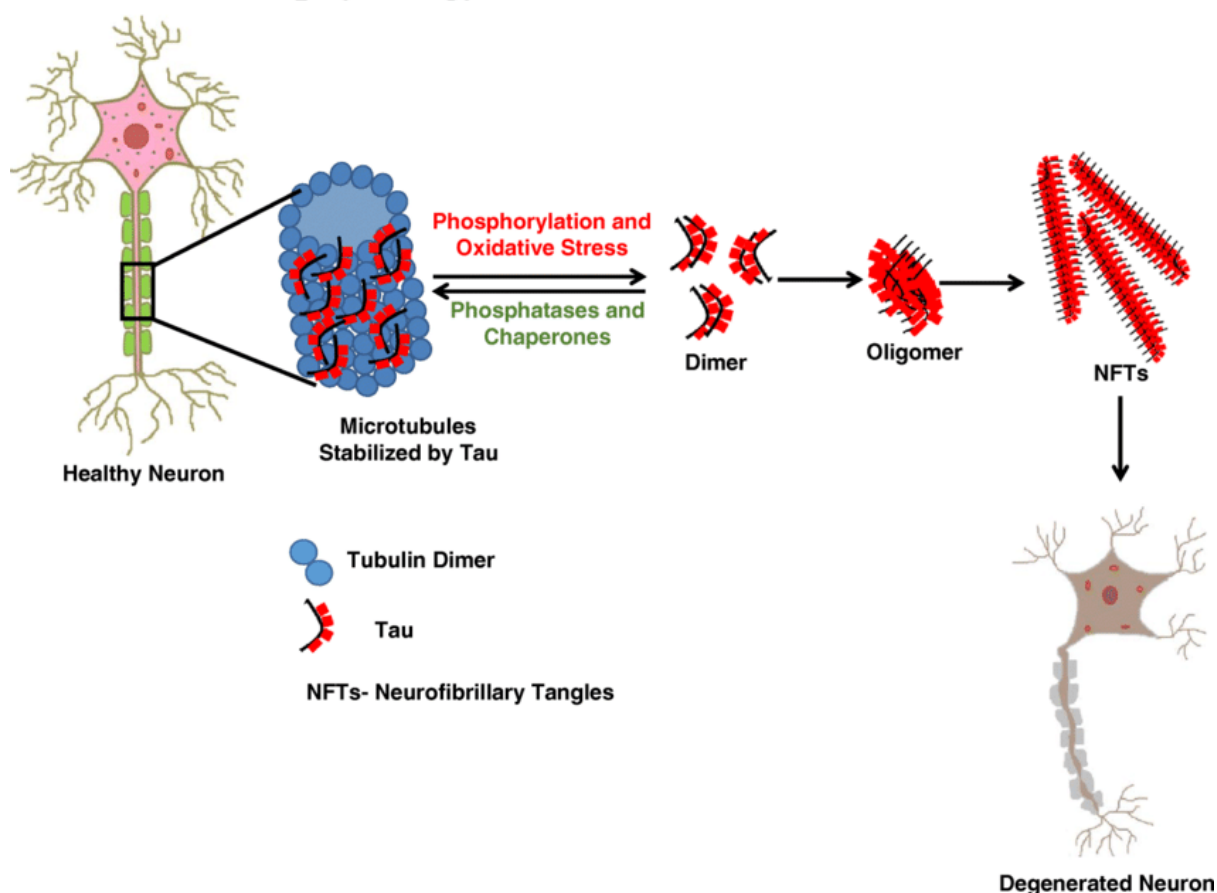
Για το πρώιμο στάδιο της νόσου Alzheimer έχουν επικυρωθεί η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) β-αμυλοειδούς στον εγκέφαλο και η μέτρηση του β-αμυλοειδούς στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Όσον αφορά την εφαρμογή της μεθόδου IP-MS έδειξε ότι ο λόγος Αβ42/Αβ40 ήταν 14% χαμηλότερος στην ομάδα με θετικό PET αμυλοειδούς (Αβ42 37,13 pg/ml, Αβ40 288,0 pg/ml) σε αντίθεση με τα μη πάσχοντα άτομα. (Nakamura, και συν., 2018). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο σύνθετος βιοδείκτης πλάσματος φάνηκε να συσχετίζεται με τα επίπεδα πλάσματος και ENY με ακρίβεια 80,4% σε άτομα με νόσο Alzheimer και είχε συγκρίσιμες επιδόσεις με το Αβ42 ENY στον προσδιορισμό της επιβάρυνσης από Αβ στον εγκέφαλο. Συνοψίζοντας, η χρήση του πλάσματος Αβ ως βιοδείκτη μπορεί να αποτελέσει χρήσιμη διαγνωστική προσέγγιση μόνο αν συνδυαστεί και με άλλα διαγνωστικά εργαλεία (Klyucherev, και συν., 2022)

- Πρωτεΐνη Tau πλάσματος

Η πρωτεΐνη Tau εκφράζεται σε αφθονία στους άξονες των νευρώνων του κεντρικού νευρικού συστήματος και ο φυσιολογικός ρόλος της είναι να προωθεί και να σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους στους νευράξονες. Η μέτρηση της συνολικής πρωτεΐνης tau (η οποία αποτελείται από φωσφορυλιωμένες όσο και από μη φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες) αντανακλά την καταστροφή και την αποσύνθεση των νευραξόνων. Με την Η φωσφορυλίωση αλλάζει το σχήμα του μορίου και η βιολογική του δραστηριότητα, όπου οι υπερφωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες tau συσσωρεύονται σε νευροϊνδιακές δεσμίδες (NFTs), οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στις παθολογικές διεργασίες της νόσου και αποτελούν παράγοντα νευροεκφυλισμού.(Εικόνα 13). Για τη διάγνωση της νόσου απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ανάλυση της πρωτεΐνης tau, η οποία επιτυγχάνεται με εξαιρετικά ευαίσθητες τεχνολογίες στο αίμα, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλιωμένης tau. (Chen, και συν., 2022). Για

παράδειγμα οι Fossati et al (2019) χρησιμοποίησαν διάφορες τεχνικές για να προσδιορίσουν την ολική tau του πλάσματος, την tau στο ENY και την φωσφορυλιωμένη tau. Έτσι για την ολική tau στο πλάσμα χρησιμοποίησαν τη τεχνολογία SIMOA (Quanterix Corporation, MA), με έναν συνδυασμό αντισώματος σύλληψης που αναγνωρίζει το αμινοξύ 16-24 και ενός αντισώματος ανιχνευτή που αναγνωρίζει το αμινοξύ 218-222. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε ψηφιακή διάταξη που έχει τη δυνατότητα προσδιορισμού της ολικής tau στο πλάσμα ή στον ορό με όριο ανίχνευσης 0,019 pg/mL. Η P-tau 181 μετρήθηκε με ένα σάντουιτς ELISA χρυσού προτύπου (INNOTEST, Fujirebio) χρησιμοποιώντας αντισώματα HT7 για σύλληψη και AT270 για ανίχνευση και ένα συνθετικό προσαρμοσμένο φωσφορυλιωμένο φωσφοπεπτίδιο θρεονίνη 181 (P-tau181 πρότυπο). Το όριο ανίχνευσης αυτής της τεχνικής είναι 15,6 pg/mL. Η ολική tau του ENY μετρήθηκε χρησιμοποιώντας ένα παρόμοιο πρωτόκολλο ELISA χρυσού προτύπου (INNOTEST, Fujirebio), που βασίζεται στη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων AT120 για σύλληψη και HT7 και BT2 για ανίχνευση. (Fossati, et al., 2019) Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι το συνολικό tau βρίσκεται αυξημένο μετά από τραυματική εγκεφαλική βλάβη και οξύ εγκεφαλικό επεισόδιο, οπότε δεν αποτελεί ειδικό δείκτη για τη νόσο Alzheimer. Ωστόσο, αυξημένες ποσότητες φωσφορυλιωμένης tau στις θέσεις P-Tau181, P-Tau217 και P-Tau231 στο ENY και στο αίμα θεωρούνται βιοδείκτες ειδικοί για τη νόσο. Η ειδικότητα αυτού του βιοδείκτη υποστηρίζεται από το σχηματισμό νευροϊνιδιακών δεσμών στον εγκέφαλο σε αυξημένα επίπεδα P-tau στο ENY. (Klyucherev, et al., 2022)

Pathophysiology of Tau in Alzheimer's Disease



Εικόνα 13: Παθοφυσιολογία της πρωτεΐνης Tau (Shibi Muralidar, 2020)

Οι Chen et al (2022) σε μια μεταανάλυσή τους κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η τεχνολογία IMR μπορεί να αυξήσει τη διαγνωστική σημασία της πρωτεΐνης tau για την ασθένεια. Διαφορετικές πρωτεΐνες tau υποδεικνύουν διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις. Π.χ. οι υπερφωσφορυλιωμένες tau σχηματίζουν συσσωματώματα νευροινιδίων (NFTs) που θεωρούνται υπεύθυνα για την απώλεια συνάψεων, της μείωση της αξονικής μεταφοράς, τη μιτοχονδριακή και κυτταροσκελετική δυσλειτουργία. Οι συγκεντρώσεις των διαφόρων ειδών tau μπορεί να σχετίζονται με την ένταση της νόσου. Έτσι οι chen et al (2022) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η IMR μπορεί να αυξήσει τη διαγνωστική αξία των p-tau και t-tau για MCI και AD. Μόνο η IMR μπορεί να ανιχνεύσει τη διαφορά του t-tau του αίματος σε υγιή άτομα από άτομα με MCI ή ανάμεσα σε υγιή άτομα και άτομα με την ασθένεια (Chen, και συν., 2022)

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης Tau στο αίμα είναι σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με την συγκέντρωση στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με τις τιμές να ανέρχονται περίπου σε 5 pg/ml και περίπου 2–300 pg/ml αντίστοιχα, δηλαδή σχεδόν 100 φορές χαμηλότερη. Τα αποτελέσματα

μιας έρευνας που διεξήχθη χρησιμοποιώντας μεθόδους SIMOA και Meso-Scale σε μια μεγάλη ομάδα ατόμων που έπασχαν από τη νόσο επιβεβαίωσαν τα αυξημένα επίπεδα φωσφορυλιωμένης Ταυ στις θέσεις P-Tau181 και P-Tau217. Μια πρόσθετη μελέτη που διεξήχθη από την Πρωτοβουλία Νευροαπεικόνισης για τη Νόσο του Alzheimer (ADNI) και τις ομάδες BIOFINDER έδειξε ότι το P-tau στο πλάσμα, καθώς και άλλοι βιοδείκτες, έχουν διαφορετικά επίπεδα σε άτομα με νόσο Alzheimer από ό,τι σε άτομα χωρίς τη νόσο. Για παράδειγμα, το P-Tau217 έδειξε μέσο όρο $0,40 \pm 0,25$ pg/ml σε νοσούντα άτομα έναντι $0,17 \pm 0,14$ pg/ml σε υγιή άτομα, ενώ το P-Tau181 έδειξε μέσο όρο $4,22 \pm 0,22$ g/ml και $2,26 \pm 4,54$ pg/ml αντίστοιχα. Με τα παραπάνω αποτελέσματα, κατανοούμε τη χρησιμότητα του P-Tau ως βιοδείκτη για τη διάκριση της νόσου από την φυσιολογική κατάσταση των υγιών ατόμων. (Klyucherev, et al., 2022)

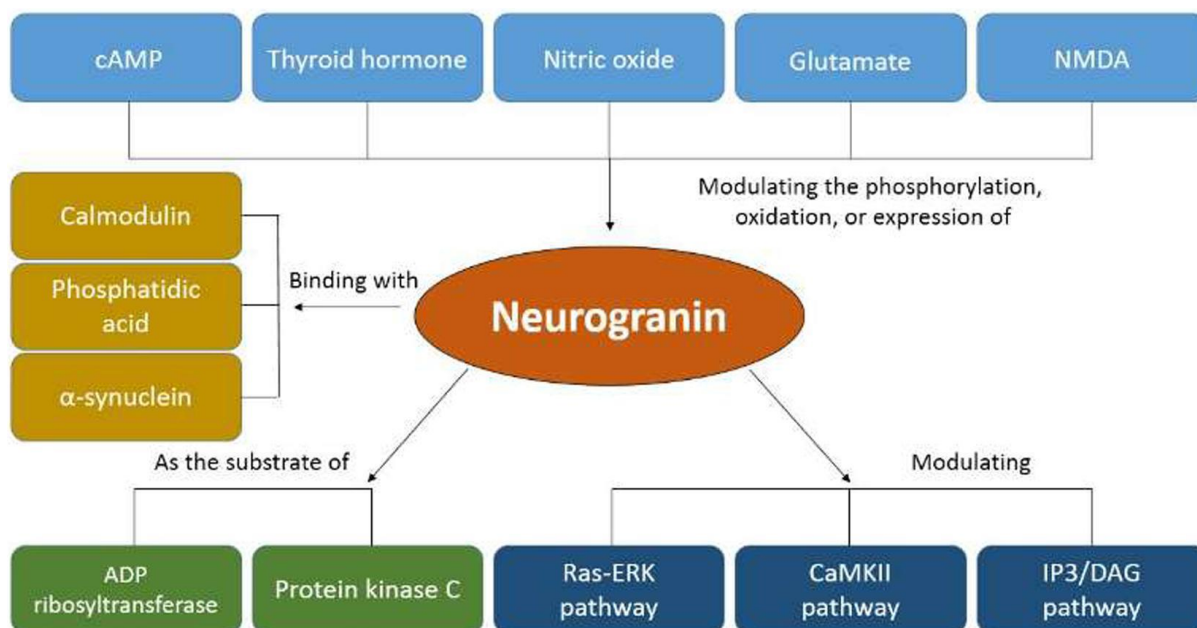
Η τεχνολογία Simoa έχει το μειονέκτημα ότι χάνει μόρια πρωτεΐνης tau κατά τη διαδικασία του καθαρισμού επομένως οι ποσότητες της πρωτεΐνης που ανιχνεύονται στο πλάσμα είναι μικρότερες με τη Simoa από ότι με την IMR. Για το λόγο αυτό, η IMR μπορεί να αποδώσει καλύτερα σε σχέση με την ELISA ή την SIMOA. Με τη βοήθεια της IMR μπορεί να ανιχνευτεί ο βαθμός βλάβης των νευρικών κυττάρων που ανακλάται στη συγκέντρωση t-tau του πλάσματος και μπορεί να αποτελέσει δείκτη για τη σοβαρότητα της νόσου. Επιπλέον, ο συνδυαστικός προσδιορισμός p-tau και t-tau μπορεί να παρέχει περισσότερες διαγνωστικές πληροφορίες (Chen, και συν., 2022)

2.3.2.2. Ρευστοί βιοδείκτες του συναπτικού εκφυλισμού

- Νευρογκρανίνη (Ng)

Η Νευρογκρανίνη (Ng) η οποία έχει διερευνηθεί ως βιοδείκτης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό στη νόσο του Alzheimer, είναι μια μετασυναπτική πρωτεΐνη με κύριο ρόλο τη ρύθμιση της λειτουργίας και της συναπτικής πλαστικότητας. Η Νευρογκρανίνη (Ng) εντοπίζει και ρυθμίζει την διαθεσιμότητα της καλμοδουλίνης η οποία εκφράζεται σε συγκεκριμένες περιοχές στο εγκέφαλο που είναι ευαίσθητες κατά την ασθένεια της νόσου Alzheimer και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C με τη μεσολάβηση Ca^{2+} (Εικόνα 14). Οι περιοχές αυτές που επηρεάζονται περισσότερο είναι ο φλοιός και ο ιππόκαμπος. Τα νοσούντα άτομα έχουν αυξημένα επίπεδα Ng στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε σχέση με τα υγιή άτομα. Τα επίπεδα

Ng ποσοτικοποιήθηκαν στις παρακάτω περιοχές στη μέση κροταφική έλικα, τον πρωτογενή οπτικό φλοιό και τον οπίσθιο υπόκαμπο χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημικές μεθόδους (Saunders, και συν., 2023). Εφαρμόστηκε η μέθοδος ELISA με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της νευρογκρανίνης που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα και βρέθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις νευρογκρανίνης στο ENY σε άτομα με την νόσο Alzheimer και MCI με τη συγκέντρωση να ανέρχεται στα 336 pg/ml (IQR 126–505) και 210 pg/ml (IQR 83– 433), αντίστοιχα. Τα υψηλότερα επίπεδα Ng στο ENY συσχετίζονται θετικά με υψηλότερες βαθμολογίες νευριτικής πλάκας Ab και μεμβρανώδους παθολογίας TAU. Όσον αφορά τις κλινικές εφαρμογές τα δείγματα που συλλέγονται θα πρέπει να λαμβάνονται με συγκεκριμένα πρωτόκολλα διότι τα αποτελέσματα στα επίπεδα της νευρογκρανίνης στο πλάσμα μεταξύ ασθενών με AD και ελέγχου δεν έχουν σημαντικές διαφορές. Για αυτόν τον λόγο τα αποτελέσματα είναι πιο αξιόπιστα με ταυτόχρονη έρευνα και άλλων βιοδεικτών. (Xin-Tong, et al., 2020) Η νευρογκρανίνη στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι αυξημένη αποκλειστικά σε ασθενείς με Alzheimer, αλλά όχι σε άλλες νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως η μετωποκροταφική άνοια, η LBD, η νόσος του Πάρκινσον ή η ατροφία πολλαπλών συστημάτων. Σε ασθενείς με Alzheimer και μετωποκροταφική άνοια υπολογίστηκε ότι η συγκέντρωση νευρογκρανίνης σε εξωσώματα ήταν σημαντικά χαμηλότερη ($232 \pm 56,5$ pg/ml και 1117 ± 227 pg αντίστοιχα) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (2208 ± 354 pg/ml). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η νευρογκρανίνη του ENY μπορεί να είναι ένας ειδικός δείκτης για τη νόσο Alzheimer. (Klyucherev, et al., 2022)



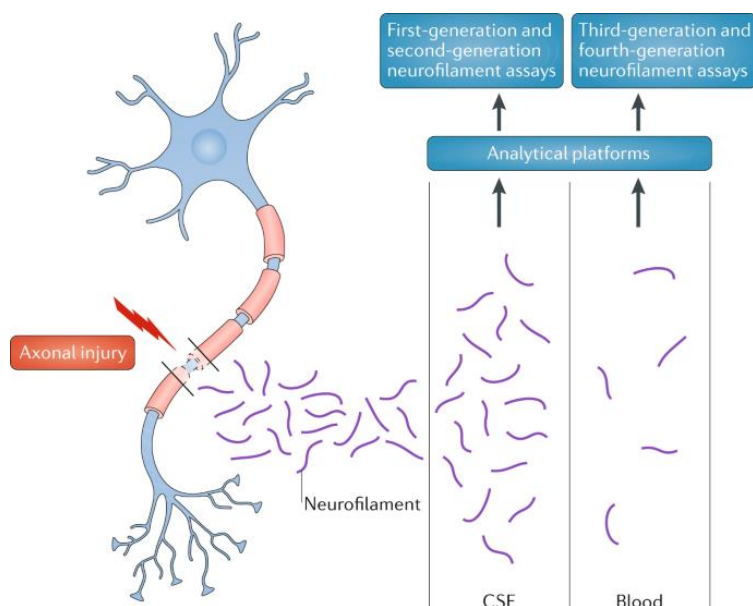
Εικόνα 14: Κυτταρική και περιφερειακή κατανομή της νευρογκρανίνης στον εγκέφαλο αρουραίου. (Xin-Tong, et al., 2020)

- NFL (neurofilament light)

Το NFL είναι μια πρωτεΐνη που αποτελεί ειδικό τμήμα του κυτταροσκελετού των νευρικών κυττάρων και χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης πλάσματος για τη βλάβη των νευραξόνων (Εικόνα 15) . Τα επίπεδα του NFL στο ENY και στο πλάσμα είναι αυξημένα σε διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως είναι η άνοια από τη νόσο του Alzheimer, η μετωποκροταφική άνοια, η σκλήρυνση κατά πλάκας και κατά την τραυματική εγκεφαλική βλάβη. Όσον αφορά την συσχέτιση των επιπέδων στο ENY και στο πλάσμα μπορεί να θεωρηθεί καλή με τις συγκεντρώσεις στο ENY να είναι σημαντικά υψηλότερες (Mielke, και συν., 2019) (Klyucherev, και συν., 2022). Ανακαλύφθηκε ότι το NFL αποτελεί έναν πολύ σημαντικό βιοδείκτη για την ανάπτυξη γνωστικής δυσλειτουργίας σε προοδευτικές μορφές της νόσου - απέδειξε να λειτουργεί καλύτερα από τις πρωτεΐνες Αβ και Ταυ όσον αφορά την κλινική σοβαρότητα της νόσου Alzheimer και την μελλοντική γνωστική ανεπάρκεια. Το NFL απελευθερώνεται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και στο αίμα μετά από νευροεκφυλισμό ή αξονική βλάβη στους κεντρικούς και στους περιφερικούς νευρώνες. (Giacomucci, και συν., 2022). Η νόσος Alzheimer και η ήπια γνωστική διαταραχή (MCI) διακρίνονται με την αυξημένη συγκέντρωση της NFL στο πλάσμα κατά την εξέλιξη της νόσου. Μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ADNI (Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative) η συσχέτιση του NFL στο αίμα ήταν θετική με την ατροφία του εγκεφάλου σε ομάδες MCI και AD, ενώ ήταν αρνητική η συσχέτιση του NFL στο ENY με το πάχος του φλοιού επίσης σε μάρτυρες με και χωρίς παθολογικό Αβ. Έτσι επιβεβαιώνεται η ικανότητα του βιοδείκτη να διακρίνει ασθενείς με γενετική προδιάθεση για AD. Αξίζει να σημειωθεί ότι η νευρογρανίνη έδειξε μεγαλύτερη συσχέτιση και ειδικότητα για την διάγνωση της νόσου σε σύγκριση με το NFL πλάσματος, με αποτέλεσμα το NFL να μην μπορεί να θεωρηθεί ειδικός δείκτης για την AD σε αντίθεση με τη νευρογρανίνη. (Klyucherev, και συν., 2022)

Σε μια μελέτη των Eratne et al. αποδείχθηκε συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων NFL στο πλάσμα και των νευροψυχολογικών ασθενειών αλλά και η χρησιμότητα του NFL του ENY στη διαφοροποίηση των νευροεκφυλιστικών νόσων από τις ψυχιατρικές διαταραχές. Βέβαια, δεν υπάρχουν ακόμη σαφή αποτελέσματα και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες. (Giacomucci, και συν., 2022)

Εν κατακλείδι, το NFL του πλάσματος είναι πιο κατάλληλος κλινικός βιοδείκτης από το NFL του ΕΝΥ, διότι είναι εφικτό να γίνουν πολυάριθμες μετρήσεις για την αξιολόγηση της εξέλιξης της νόσου και τον προσδιορισμό των νευροεκφυλιστικών και γνωστικών αλλαγών (Mielke, και συν., 2019).



Εικόνα 15 :Απεικόνιση της πρωτεΐνης NFL στο πλάσμα και στο ΕΝΥ (Khalil, 2018)

2.3.2.3 Βιοδείκτες νευροφλεγμονής

Ο όρος νευροφλεγμονή αναφέρεται στο ευρύ φάσμα των φλεγμονωδών αποκρίσεων που προέρχονται από τραυματισμό ή ασθένεια. Οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου Alzheimer είναι η χρόνια νευροφλεγμονή, τα μικρογλοιακά κύτταρα και η αστρογλοΐωση. Τα μικρογλοιακά είναι μόνιμα έμφυτα ανοσοκύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) με καθοριστικό ρόλο στην άμυνα. Ενεργοποιούνται δεσμεύοντας Αβ. Έτσι υφίσταται ενεργοποίηση των μικρογλοίων και γίνεται εξάπλωση των νευροϊνιδικών πλεγμάτων και των πλακών β αμυλοειδούς με αποτέλεσμα απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών. Ανάλογα με την εξέλιξη της φλεγμονής τα μικρογλοία παράγουν διαφόρους φαινότυπους. Γενικά η παθολογική συσσώρευση του Αβ και του NFT στον εγκέφαλο είναι ο κύριος παράγοντας για νευροφλεγμονώδεις αποκρίσεις στη νόσο Alzheimer και κατά συνέπεια για την ενεργοποίηση νευρογλοιακών κυττάρων όπως προαναφέρθηκε. Υπάρχουν δυο βασικοί φαινότυποι μικρογλοιακής ενεργοποίησης, η μορφή 1 και 2. Η μορφή 1 χαρακτηρίζεται από την αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, του παράγοντα

νέκρωσης όγκου-άλφα (TNF-α) ιντερλευκίνων IL-1β, IL-6, IL-12 και IL-18, ιντερφερόνης γάμμα (IFN-γ), χημειοκίνων όπως η μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη 1 (MCP-1) και νευροτοξικών παραγόντων. Η δεύτερη μορφή χαρακτηρίζεται από την απελευθέρωση αρκετών αντιφλεγμονωδών κυτοκινών - ιντερλευκινών IL-4, IL-10, IL-13 και μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα βήτα (TGF-β). Κατά την διάρκεια της νόσου Alzheimer τα μικρογλοία αλλάζουν από τον φαινότυπο ενεργοποίησης M2 σε M1. Οι κυτταροκίνες απελευθερώνονται από ανοσοκατασταλτικά κύτταρα και υπάρχουν οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και οι αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-6, IL-1β και TNF-α θεωρούνται βιοδείκτες για την προφλεγμονώδη απόκριση στην AD με αυξημένες συγκεντρώσεις, ενώ οι αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-10, IL-4 και TGF-β περιορίζουν την προφλεγμονώδη ενεργοποίηση στη AD. (Angiulli, και συν., 2021)

Οι χημειοκίνες είναι χημειοτακτικές κυτταροκίνες οι οποίες παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή. Οι χημειοκίνες ως βιοδείκτες είναι η μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη 1 (MCP-1), η ιντερλευκίνη 8 (IL-8) γνωστή και ως CXCL8 και η φρακταλκίνη CX3CL1. Η ιντερλευκίνη 8 (IL-8) παράγεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στην περιφέρεια με αυξημένες τιμές στο αίμα και στο ENY σε άτομα με AD. Ενώ η φρακταλκίνη CX3CL1 εκφράζεται κυρίως στο ΚΝΣ από νευρώνες και γλοιακά κύτταρα με αντιφλεγμονώδη δράση. Έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της φρακταλκίνης είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με MCI σε σύγκριση με ασθενείς με σοβαρή AD.

Τα περισσότερα νευρογλοιακά κύτταρα στον εγκέφαλο είναι τα αστροκύτταρα και βρίσκονται έμφυτα στο ανοσοποιητικό σύστημα συγκεκριμένα στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Αποτελούν ένα δομικό μέρος του αιματολογικού φραγμού (BBB - blood-brain barrier) περιορίζοντας την είσοδο από διάφορες ουσίες στον εγκέφαλο. Στη νόσο Alzheimer τα αστροκύτταρα συνδέονται με τις εναποθέσεις Αβ απομονώνοντας έτσι το υγιή ιστό. Ένας βιοδείκτης για την ενεργοποίηση των αστροκυττάρων είναι η πρωτεΐνη YKL-40. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αλλιώς χιτίνάση 3, μοιάζει με την πρωτεΐνη-1 (CHI3L1), γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των ανθρώπινων χιτυνασών και πήρε το όνομά της από τα τρία N-τελικά αμινοξέα της -τυροσίνη (Y), λυσίνη (K) και λευκίνη (L) με μοριακό βάρος 40 kDa. Η μεταγραφή της YKL-40 πραγματοποιείται από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες που έχει ως αποτέλεσμα φλεγμονώδεις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα ή στην περιφέρεια. Ύστερα από μελέτες η πρωτεΐνη στην AD εμπλέκεται στη φαγοκυττάρωση Αβ και στο σχηματισμό αμυλοειδούς πλάκας. Κατά την ασθένεια Alzheimer η YLK-40 αυξάνεται στα αστροκύτταρα σε συνθήκες νευροφλεγμονής. Μετά από μελέτες ανακαλύφθηκε ότι η YLK-40

είναι αυξημένη σε άτομα με AD από ότι σε υγιή άτομα. Όμως ασθενείς με ήπια AD εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τους ασθενείς με μέτρια/σοβαρή AD. Βέβαια ο συγκεκριμένος βιοδείκτης δεν είναι χρήσιμος για προκλινικές μελέτες και η YLK-40 του πλάσματος επίσης δεν φαίνεται να επιδεικνύει προγνωστική χρησιμότητα για τη γνωστική έκπτωση MCI. (Angiulli, και συν., 2021)

Ένα ακόμα μόριο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν βιοδείκτης είναι η προγκρανουλίνη. Η προγκρανουλίνη με μοριακό βάρος 88 kDa και τα επεξεργασμένα προϊόντα της με μοριακό βάρος 6 kDa ανήκουν στην κατηγορία ορμονών, εκκρινόμενων πρωτεϊνών με λειτουργίες τόσο περιφερειακά και όσο και στον εγκέφαλο. Η έκφραση της προγκρανουλίνης που πραγματοποιείται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στους νευρώνες και μικρογλοία και συμμετέχει στη ρύθμιση της νευροφλεγμονής, μειώνοντας τη μικρογλοία και την αστρογλοίωση, αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας. Έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας βιοδείκτης για έγκαιρη πρόβλεψη μεταξύ των ασθενών διότι τα επίπεδα της ορμόνης αυξάνονται 10 χρόνια πριν από την κλινική εμφάνιση της νόσου. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την προγκρανουλίνη (GRN) όταν υποστεί ετερόζυγες μεταλλάξεις και συνεπώς απώλεια λειτουργίας έχει ως αποτέλεσμα την μετωποκροταφική άνοια (FTD) και συσχετίστηκε με μειωμένα επίπεδα έκφρασης προγκρανουλίνης στο αίμα όσο και στον εγκέφαλο και μεγάλο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου. Σε μια άλλη μελέτη, οι ερευνητές βρήκαν αυξημένη έκφραση του GRN (που κωδικοποιεί την προγκρανουλίνη) στο αίμα ασθενών με AD και MCI. Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα δεν συσχετίστηκαν με τη συγκέντρωση γκρανουλίνης στο πλάσμα, η οποία δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων σύγκρισης. Αυτό εξηγείται επειδή η μέθοδος ELISA δεν μπορεί να ανιχνεύσει αλλαγές στην προγκρανουλίνη λόγω των πολύπλοκων μετα-μεταφραστικών αλλαγών που υφίσταται. (Cooper, και συν., 2018) (Klyucherev, και συν., 2022).

Τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (CAM) παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες παθολογικές φλεγμονώδεις διεργασίες στη νόσο του Alzheimer. Μια ακόμη ομάδα βιοδεικτών φλεγμονής στην AD είναι το μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης 1 (ICAM-1), το ενεργοποιημένο μόριο προσκόλλησης κυττάρων λευκοκυττάρων (ALCAM) και το μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων (VCAM-1). Ανήκουν στην ομάδα των γλυκοπρωτεϊνών κυτταρικής επιφάνειας, βρίσκονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και ανοσοκύτταρα και συμμετέχουν στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στη μεταφορά των λευκοκυττάρων στον εγκέφαλο. Μετά από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, το ALCAM και το VCAM-1 σε συνδυασμό με την ApoE4, την ηλικία και το MMSE (Mini-

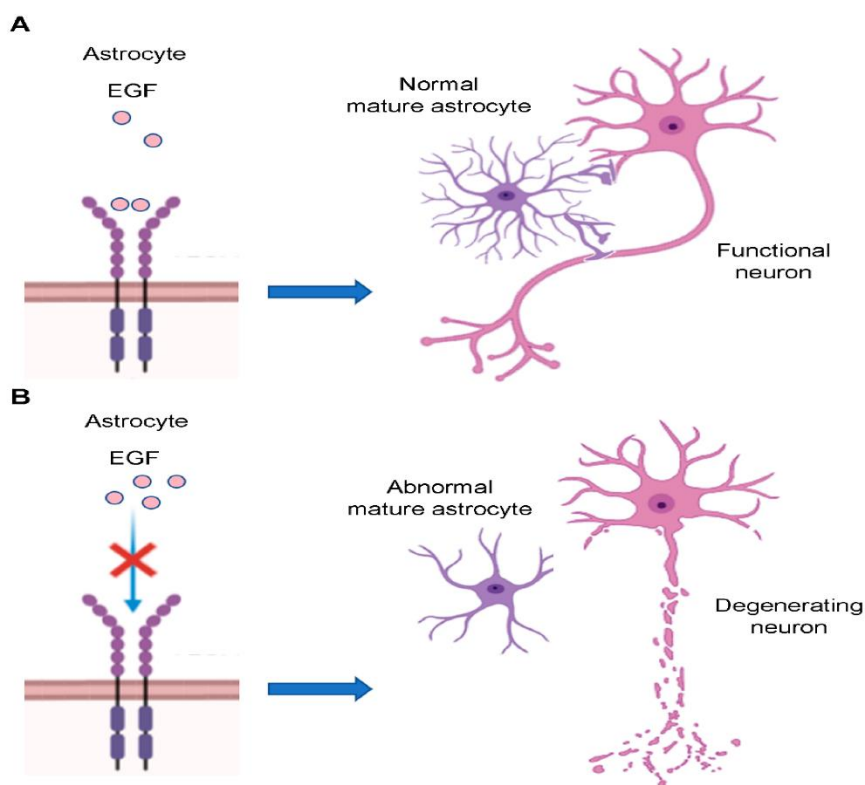
Mental State Examination- μικρή εξέταση ψυχικής κατάστασης) μπόρεσαν να προβλέψουν την ασθένεια AD με υψηλή ακρίβεια. Το ICAM-1 εκκρίνεται από το αγγειακό ενδοθήλιο και μπορεί να συμμετάσχει στην προσκόλληση αιμοπεταλίων, λευκών αιμοσφαιρίων και αγγειακού ενδοθηλίου. Ενώ εκφράζεται στα φυσιολογικά κύτταρα σε χαμηλά επίπεδα, μόλις ξεκινήσει η φλεγμονή η έκφρασή του αυξάνεται, με αποτέλεσμα να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονώδους απόκρισης. Σε ασθενείς που πάσχουν από AD υπάρχει αύξηση των επιπέδων του ICAM-1 στον ορό σε σύγκριση με τα υγιή άτομα ή με τους ασθενείς με μη φλεγμονώδεις νευρολογικές παθήσεις (NINDs). Το ICAM-1 στο ENY ήταν αυξημένο σε πρώιμους, προκλινικούς και MCI ασθενείς με AD. (Chen, και συν., 2022)

Ένας τρόπος απομόνωσης ορισμένων φλεγμονωδών βιοδεικτών είναι η απομόνωσή τους από το αίμα ή τα παράγωγά του και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεών τους με ELISA ή με ανοσοδοκιμασίες όπως η ανοσοδοκιμασία ηλεκτροχημειοφωταύγειας, η ανοσοδοκιμασία Mesoscale Discovery ή η V-PLEX. Όσον αφορά την ειδικότητα των βιοδεικτών για τη AD, δεν είναι ακόμη σαφές κατά πόσον μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της γνωστικής έκπτωσης και την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των θεραπειών της AD που αποσκοπούν στη μείωση της νευροφλεγμονής. (Chen, και συν., 2022)

2.3.2.4 Πρωτεϊνικοί βιοδείκτες και δοκιμασία PEA (Proximity extension assay)

- Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)

Ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) έχει κυριαρχικό ρόλο με μεγάλη ενεργότητα στην αρχική ανάπτυξη του εγκεφάλου και μειώνεται κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Εικόνα 16). Βέβαια η ενεργότητα του αυξάνεται όταν εντοπιστούν η μείωση της νευρικής λειτουργίας και η ατροφία του εγκεφάλου προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιοστατική νευρωνική δεξαμενή. Όπως έχει προαναφερθεί κατά τη νόσο του Alzheimer σχηματίζονται θραύσματα της πρωτεΐνης βήτα αμυλοειδούς (Aβ1-42) με αποτέλεσμα να αυξάνεται η έκφραση του EGFR. Όταν πρόκειται για εναπόθεση ενός μη επιθυμητού μορίου στο EGFR οδηγεί σε εκτεταμένη παραγωγή Aβ1-42 και φωσφορυλίωση tau και κατά συνέπεια σε παθογένεια. (Jayaswamy, και συν., 2023)



Εικόνα 16 (Α. Τα ώριμα αστροκύτταρα σχηματίζουν δομές που περιβάλλουν τους νευράξονες ώστε να επιτελούν τις νευρωνικές λειτουργίες. Η σηματοδότηση EGFR διεγείρει τη παραπάνω διαδικασία. (Β) Ο αποκλεισμός του EGFR κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ αναστέλλει την ωρίμανση των αστροκυττάρων που οδηγούν σε νευρωνικό εκφυλισμό (Romano & Bucci, 2020)

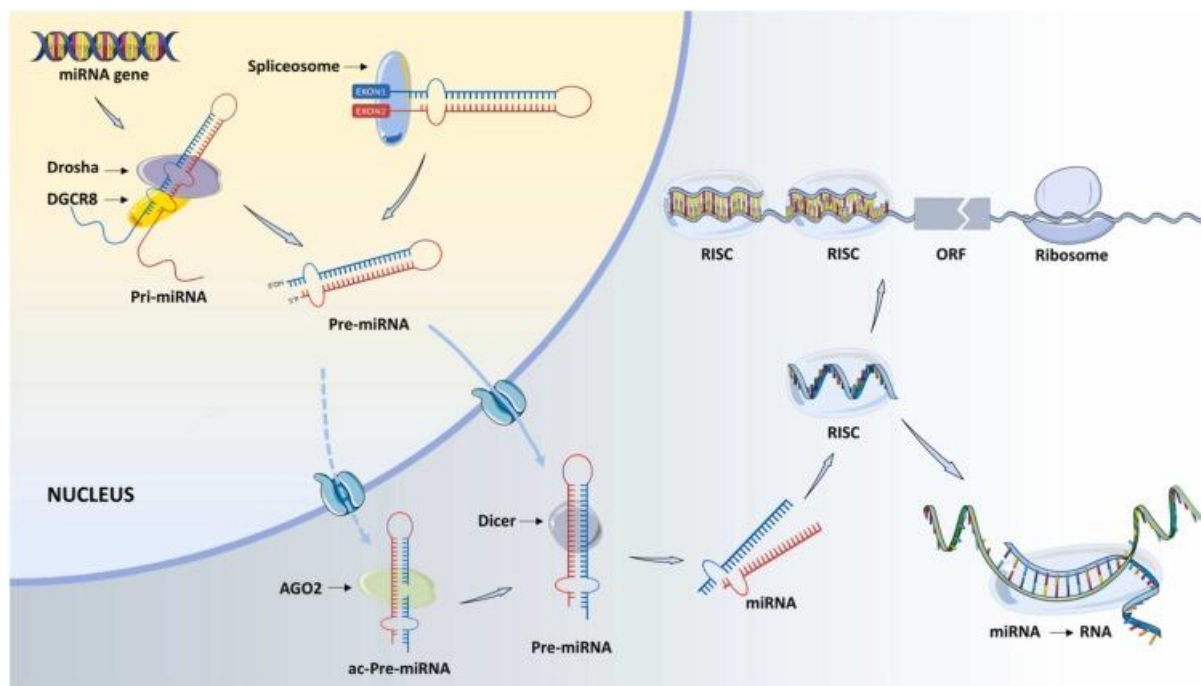
- Παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (PP)

Το Παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (PP - νευροπεπτίδιο) είναι ακόμα ένας βιοδείκτης στο πλάσμα που σχετίζεται με ήπια γνωστική εξασθένηση (MCI) και την άνοια AD. Το PP σχηματίζεται από τα κύτταρα F των παγκρεατικών νησίδων Langerhans και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος μετά την πρόσληψη τροφής. Η υπερέκφραση του PP έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη πρόσληψη τροφής, μεγάλη απώλεια βάρους, αναιμία και ελλείψεις σε θρεπτικών συστατικά που είναι απαραίτητα για τη νευρωνική λειτουργία. Οι περιοχές που επηρεάζονται στην νόσο Alzheimer από το PP και άλλα πολυπεπτίδια είναι ο ιππόκαμπος και ο υποθάλαμος. Βρέθηκε ότι τα υψηλά επίπεδα PP σχετίζονται με την απώλεια νευρώνων και συνεπώς τη παθογένεση του MCI και τη νόσο AD. (Roberts, και συν., 2015)

Η έρευνα για τον εντοπισμό πρόσθετων πρωτεϊνικών βιοδεικτών για τη νόσο Alzheimer επιτυγχάνεται με τη χρήση σύγχρονων μεθόδων. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι ένας ανοσολογικός προσδιορισμός διαφορετικός από τον συνηθισμένο, ο προσδιορισμός επέκτασης εγγύτητας (PEA). Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα για κάθε πρωτεΐνη που πρόκειται να εξεταστεί έτσι ώστε να αυξηθεί η ειδικότητα. Με αυτήν την μέθοδο εξετάστηκαν μερικοί βιοδείκτες που έχουν ήδη αναφερθεί η YKL-40, χιτινάση 1, κυτοκίνη, ALCAM. Αξιοσημείωτο είναι ότι χρησιμοποιείται για έγκαιρη διάγνωση και συνεχή παρακολούθηση. Η πρωτεΐνη NEL τύπου 1, η ανθρώπινη καλλικρεΐνη 14 και η κεντρίνη-2 ανιχνεύθηκαν σε πρώιμο στάδιο, ενώ η κινάση τυροσίνης-πρωτεΐνης Lyn, η πρωτεϊνική κινάση C θήτα και ο υποδοχέας O του ανασταλτικού παράγοντα λευχαιμίας ανιχνεύθηκαν σε ενδιάμεσο στάδιο της νόσου. (Klyucherev, και συν., 2022)

2.3.2.5. MicroRNAs (miRNAs)

Τα miRNAs είναι μονόκλωνα μη κωδικοποιητικά μόρια RNA με μήκος 19-25 νουκλεοτίδια και έχει βρεθεί ότι ενέχονται στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών γονιδίων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Υπολογίζεται ότι πάνω από το 50% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στα θηλαστικά ελέγχονται από τα miRNAs. Τα miRNAs δεσμεύονται στη 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'UTR) των mRNAs και έτσι αναστέλλουν τη μετάφρασή τους ή προκαλούν την αποικοδόμησή τους. Με αυτό το τρόπο ελέγχουν τη σύνθεση των πρωτεϊνών. (Andrew D. Penman, 2014) (Sen Liu a b c, 2022). Τα miRNAs σχηματίζονται από πρόδρομα μόρια Pri-miRNAs τα οποία μετατρέπονται σε pre-miRNAs στο πυρήνα με τη βοήθεια ενζύμων όπως το σύμπλεγμα Drosha-DGCR8 της οικογένειας Ribonuclease III (RNaseIII). Στην συνέχεια τα pre-miRNAs μετατρέπονται στα μονόκλωνα miRNAs στο κυτταρόπλασμα με τη δράση του ενζύμου Dicer. Σε αρκετές περιπτώσεις, τα miRNAs σχηματίζονται από μικρά εσώνια χωρίς να γίνει κατάλυση από το σύμπλοκο Drosha-DGCR8. (Sen Liu a b c, 2022). Στη συνέχεια, τα miRNAs ενώνονται με πρωτεΐνες και σχηματίζουν το σύμπλοκο RISC που ελέγχει τη μετάφραση (Εικόνα 17)

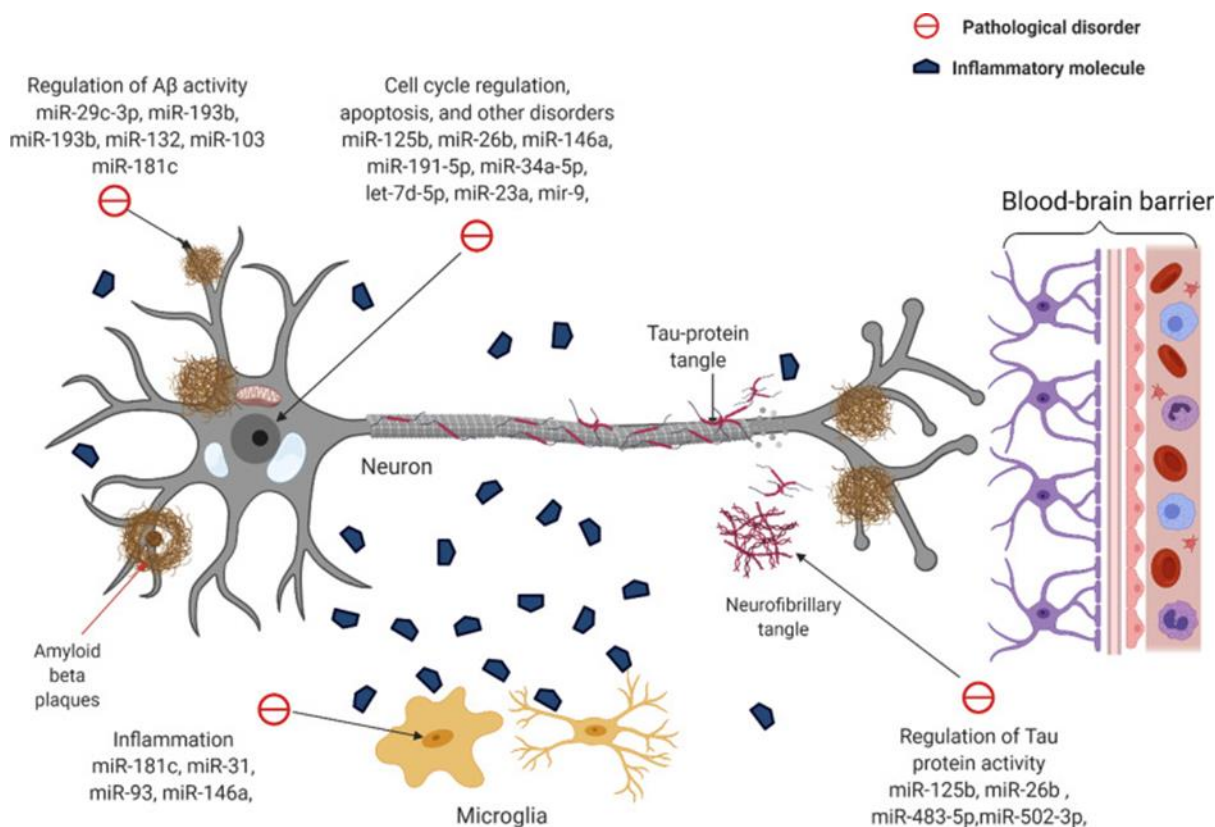


Εικόνα 17: Διάγραμμα βιοσύνθεσης και λειτουργίας του miRNA. Το πρόδρομο Pri-miRNA καταλύεται από το Drosha-DGCR8 για να σχηματίσει το Pre-miRNA και το Pre-miRNA καταλύεται από το Dicer για να σχηματίσει μονόκλωνο miRNA το οποίο στη συνέχεια ενώνεται με πρωτεΐνη και σχηματίζεται το σύμπλοκο RISC (Sen Liu a b c, 2022).

Τα miRNAs σχηματίζονται και δρουν στο κυτταρόπλασμα αλλά μπορεί να βρεθούν στον εξωκυττάριο χώρο και σε βιολογικά υγρά λόγω καταστροφής κυττάρων ή έκκρισης μέσω κυστιδίων. Όταν τα miRNAs σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες τότε γίνονται πολύ πιο σταθερά, η ανίχνευσή τους πολύ πιο ειδική και για αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες. (Klyucheren, και συν., 2022). Στη περίπτωση της AD, έχει βρεθεί ότι τα miRNAs απορρυθμίζονται στον εγκέφαλο, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και στον ορό ή στο πλάσμα ασθενών (Galimberti, 2014). Η απορρύθμιση αυτή μπορεί να είναι προς τα κάτω ή προς τα πάνω και έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με λειτουργίες όπως η κυτταρική γήρανση. (Amakiri N, 2019)

Έχει βρεθεί ότι μια πληθώρα miRNAs ρυθμίζουν τα επίπεδα έκφρασης της APP (amyloid precursor protein APP) στο 3' UTR. Η APP είναι το πρόδρομο μόριο από το οποίο με την επίδραση του BACE1 παράγεται η Αβ. Σε μια μελέτη που διεξήγαγε ο Lahiri, το miR-346 βρέθηκε να υπερεκφράζεται με αποτέλεσμα ανοδική ρύθμιση της APP και αυξημένη παραγωγή του Αβ σε ασθενείς με AD. (Amakiri N, 2019) (Εικόνα 18). Επίσης το miR-193b που παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του AD βρέθηκε να είναι σε μειωμένα επίπεδα τους ασθενείς με AD. Το miR-132, γνωστό ως «NeurimmiR», σχετίζεται με πολλές νευροφυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός βιοδείκτης στη AD

καθώς μπορεί να εμπλέκεται στην εξέλιξη της παθολογίας του Αβ και του tau. (Zhang M, 2021).



Εικόνα 18: Στην συγκεκριμένη εικόνα παρατηρείται η επίδραση των MiRNAs στη ρύθμιση του μεταβολισμού του Αβ, της πρωτεΐνης Tau, στη νευροφλεγμονή το οξειδωτικό στρες και τις διαταραχές του κυτταρικού κύκλου. (Klyucherev, et al., 2022)

Υπάρχουν αρκετές αξιόπιστες και προσιτές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των miRNAs. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι η RT-qPCR δηλαδή η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής που έχει προσαρμοστεί ειδικά για το προσδιορισμό των miRNAs. Πιο συγκεκριμένα, λόγω του μικρού μεγέθους των μορίων η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται με χρήση εκκινητών RT- stem loop δηλ. με εκκινητές τύπου βρόχου ή με πολυαδενυλίωση και στη συνέχεια υβριδοποίηση με εκκινητές poly-T ώστε να σχηματιστεί τελικά το cDNA. Για το προσδιορισμό αυτό υπάρχουν διαθέσιμα κιτ που χρησιμοποιούνται ευρέως κυρίως όταν είναι γνωστή η ακριβής αλληλουχία του miRNA στόχου και όταν απαιτείται η ανάλυση μικρού αριθμού στόχων. (Forero, Gonzalez-Giraldo, Castro-Vega, & Barreto, 2019). Για μαζική ανάλυση, οι πιο κατάλληλες μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού miRNAs είναι ο υβριδισμός μέσω μικροσυστοιχιών και η αλληλούχιση Nanostring. (Kappel & Keller, 2017). Η τεχνολογία μικροσυστοιχιών χρησιμοποιείται ευρέως

για μελέτες ανάλυσης γονιδιακής έκφρασης. Η βασική αρχή της μεθόδου είναι ο υβριδοποίηση νουκλειικών οξέων που πραγματοποιείται μεταξύ των μορίων στόχων και των συμπληρωματικών. Το βασικό πλεονέκτημα είναι ότι ποσοτικοποιούν μεγάλο αριθμό miRNAs σε ένα μόνο πείραμα με λιγότερο κόστος σε σχέση με μια τεχνική αλληλούχισης που περιγράφεται παρακάτω. Ωστόσο οι μικροσυστοιχίες έχουν πολύ μικρή δυνατότητα ανακάλυψης νέων αλληλουχιών miRNAs ούτε μπορούν να διακρίνουν διαφορετικές παραλλαγές ενός δεδομένου μορίου. Επιπλέον, η μέθοδος δεν μπορεί να διακρίνει ένα μόριο πρόδρομου miRNA από το ώριμό του, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα μιας. (Kappel & Keller, 2017) Όταν εκτός από το ποσοτικό προσδιορισμό, απαιτείται και η ταυτοποίηση νέων ή σπάνιων miRNAs, το πιο ισχυρό εργαλείο είναι η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS). Ένα βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι όχι μόνο μπορεί να προσδιορίσει ποσοτικά γνωστές αλληλουχίες π.χ. miRNAs αλλά να αναγνωρίσει και να ποσοτικοποιήσει άγνωστες μέχρι τότε αλληλουχίες. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι ότι η τεχνική επιτρέπει την ανάλυση της έκφρασης miRNAs από πολλά δείγματα σε ένα μόνο πείραμα, εκμηδενίζοντας έτσι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Ακόμη η NGS είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και μπορεί να προσδιορίσει ποσοτικά με μεγάλη ακρίβεια τόσο miRNAs που βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο δείγμα όσο και miRNAs που βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, σε ένα μόνο πείραμα. Επιπλέον, η τεχνική μπορεί να ανιχνεύσει και να προσδιορίσει παραλλαγές ενός συγκεκριμένου miRNA. Συνήθως τα ώριμα MiRNAs περιλαμβάνουν ένα εύρος μεγεθών γύρω από τα 22nt που οφείλονται κυρίως σε 3- μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις. Ωστόσο αυτό μπορεί να είναι και μειονέκτημα της μεθόδου καθώς τα μετάρφα που προσδιορίζονται μπορεί να μην αντιστοιχούν σε λειτουργικά miRNAs. (Kappel & Keller, 2017). Ωστόσο η τεχνική αυτή είναι πιο ακριβή σε σχέση με τις προηγούμενες και απαιτείται ισχυρή βιοπληροφορική βάση για αξιόπιστη ανάλυση. Έτσι οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται εξαρτώνται από τις ανάγκες και το προϋπολογισμό του κάθε εργαστηρίου και συχνά είναι ένας συνδυασμός μεθόδων αλληλούχισης ή μικροσυστοιχιών και RT-qPCR. (Klyucherev, et al., 2022)

Η ήπια γνωστική εξασθένηση (mild cognitive impairment ,MCI) είναι μια μεταβατική κατάσταση μεταξύ της φυσιολογικής γήρανσης και της νόσου, οπότε και αποτελεί στόχο για την ανακάλυψη βιοδεικτών που σχετίζονται με την ασθένεια. Σε μελέτες που έγιναν μελετήθηκαν με τη χρήση RT-qPCR 20 ζεύγη miRNAs στο πλάσμα αίματος ασθενών με MCI. Η ανάλυση έδειξε ότι αρκετά ζεύγη miRNAs και συγκεκριμένα τα miR-191-miR-101, miR-

miR-125b και miR-103-miR-222, έχουν τη δυνατότητα να διακρίνουν την ήπια γνωστική εξασθένηση σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα. (Kayano, et al., 2016). Στα ίδια συμπεράσματα έχουν καταλήξει και άλλες μελέτες που υποδεικνύουν ότι τα miR-191, miR-103, miR-125b και miR-222 είναι απορρυθμισμένα σε δείγματα αίματος ασθενών με AD και θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες για την ανίχνευση της νόσου (Wang, Chen, & Zhang, 2020).

Επίσης άλλα miRNAs που μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για την ανίχνευση της πρώιμης AD είναι τα miR-34a-5p και τα miR-545-3p. Ωστόσο η έντονη μεταβλητότητα της ανάλυσης των miRNAs αυτών μεταξύ διαφορετικών νοσοκομείων είναι ανασταλτικός προάγοντας για την ευρεία κλινική χρήση τους. Επιπλέον φαίνεται ότι και η ηλικία του ασθενούς επηρεάζει τα αποτελέσματα των αναλύσεων. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ηλικία μπορεί να επηρεάσει το προφίλ των miRNAs στο αίμα, επομένως οι μελέτες για την επικύρωση των miRNAs ως βιοδείκτες θα πρέπει να είναι εναρμονισμένες ως προς το ηλικιακό προφίλ (Fehlmann, et al., 2020). Οι Xie et al (2015) στη μελέτη τους έδειξαν ότι τα MiR-206 και miR-132 υποεκφράζονται σε ασθενείς με ήπια γνωστική εξασθένηση σε σχέση με υγιή άτομα που ταιριάζουν στην ηλικία και το φύλο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυτό το ζεύγος miRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες για τη διάγνωση της MCI (Xie, et al., 2015). Άλλοι πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες είναι τα miR-146a και miR-181a, τα οποία βρέθηκαν σε αυξημένες συγκεντρώσεις στον ορό ασθενών με MCI που στη συνέχεια εξελίχθηκε σε AD (Ansari, et al., 2019).

Ένας άλλος σημαντικός τομέας έρευνας για τη χρήση των miRNAs ως βιοδεικτών είναι η δυνατότητα χρησιμοποίησής τους για τη διαφοροποίηση των σταδίων της AD. Σε μελέτες με τη χρήση μικροσυστοιχιών και RT-qPCR εξετάστηκαν 84 miRNAs στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με AD και με άλλες νευρολογικές παθήσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση της συκέντρωσης των miR-125b, miR-23a και miR-26b στον ορό των ασθενών με νόσο Alzheimer. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από άλλες έρευνες όπου οι ασθενείς έπασχαν εκτός από AD και από φλεγμονώδεις νευρολογικές παθήσεις καθώς και από μετωποκροταφική άνοια. Όλα αυτά τα αποτελέσματα συγκλίνουν ότι τα παραπάνω miRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη διαφορική διάγνωση της AD (Galimberti, 2014).

Σε αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν καταλήξει και πλήθος άλλων δημοσιευμένων μελετών που καταδεικνύουν τη χρησιμότητα των πληθώρας miRNAs ως βιοδεικτών για τη διάγνωση και τη

διαφοροποίηση της νόσου. Οι Ludwig et al (2019) σε μια μεγάλη μελέτη με 465 συμμετέχοντες εντόπισαν τουλάχιστον 11 miRNAs με σημαντικές αλλαγές στην έκφρασή τους σε ασθενείς με AD σε σχέση με τα υγιή άτομα. Από αυτά τα πιο σημαντικά ήταν τα miR-532-5p, miR-26a, miR-26b-5p καθώς και το miR-103 (Ludwig, et al., 2019). Ειδικά το miR-103 βρέθηκε να είναι σημαντικά μειωμένο σε ασθενείς με AD, ενώ συσχετίστηκε θετικά με τη βαθμολογία Mini Mental State Examination (MMSE) και αρνητικά με τη σοβαρότητα της άνοιας (Wang, Chen, & Zhang, 2020).

Επιπλέον τα miRNAs μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου κυρίως όσο αφορά στη θεωρία των πλακών αμυλοειδούς, τη συσσώρευση της Tau, τη φλεγμονή των νευρικών κυττάρων, τι οξειδωτικό στρες και τις ανωμαλίες του κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα το miR-125b έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται στον εγκέφαλο ασθενών με AD και σχετίζεται με αυξημένη έκφραση των γονιδίων της κινάσης Tau (p53/CDK5R1, CDK5R1, ERK1 και ERK2) καθώς και με υποέκφραση των γονιδίων της φωσφατάσης Tau (DUSP6 και PPP1CA). Έχει βρεθεί ότι το miR-125b προσδένεται στη 3'-αμετάφραστη περιοχή των mRNAs των παραπάνω γονιδίων της φωσφατάσης επηρεάζοντας έτσι την έκφρασή τους (Banzhaf-Strathmann, et al., 2014). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι το miR-125b μειώνει την ρύθμιση του κυκλινοεξαρτώμενου αναστολέα της κινάσης 2A οδηγώντας έτσι σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των νευρογλοιακών κυττάρων (Pogue, et al., 2010). Επιπλέον, το miR-125b ρυθμίζεται έντονα προς τα πάνω από τον πυρηνικό παράγοντα kappa-light-chain-enhancer των ενεργοποιημένων Β-λεμφοκυττάρων με αποτέλεσμα την ανάπτυξη νευροφλεγμονής καθώς επηρεάζεται το mRNA του παράγοντα CFH (complement factor H). Όλα τα παραπάνω παραδείγματα δείχνουν τη σημασία των miRNAs στην ανάπτυξη της νόσου καθώς πολλά από αυτά έχουν πλειοτροπικά αποτελέσματα και επομένως είναι δυνητικά χρήσιμοι βιοδείκτες για τη διαφορική διάγνωση της ασθένειας αλλά και το προσδιορισμό των σταδίων της (Klyucherev, και συν., 2022).

2.3.2.6. Οφθαλμικοί δείκτες

Μεγάλο ενδιαφέρον και μεγάλη χρησιμότητα έχει αποδειχθεί για τους οφθαλμικούς βιοδείκτες στη νόσο Alzheimer. Ο κυριότερος λόγος είναι η έγκαιρη διάγνωση σε πρώιμο στάδιο της νόσου αλλά και η παρακολούθηση της εξέλιξής της όσο και η ανταπόκριση στη θεραπεία. Όπως και στον εγκέφαλο έτσι και στο μάτι μπορεί να βρεθούν πολλές νευρικές και συστηματικές διαταραχές με γρήγορες μεθόδους ανάλυσης και μη επεμβατικές. (Majeed, Marwick, Yu, Fadavi, & Tavakoli, 2021) Η μέθοδος οπτική τομογραφία συνοχής (OCT) είναι

μια τεχνολογία υψηλής ανάλυσης και χρησιμοποιείται για την διάγνωση της AD σε πρώιμο στάδιο. Σε ασθενείς με Alzheimer παρατηρήθηκαν εκφυλιστικές αλλαγές στους οφθαλμούς και πιο συγκεκριμένα διαταραχές στον αμφιβληστροειδή (Klyucherev, et al., 2022). Ως πιθανοί οφθαλμικοί βιοδείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση της πρώιμης νόσου είναι τα δάκρυα, τα κερατοειδικά νεύρα, ο αμφιβληστροειδής, η οπτική λειτουργία και η παρακολούθηση της κίνησης των ματιών. Οι οφθαλμικοί βιοδείκτες διακρίνονται σε δομικούς βιοδείκτες και λειτουργικούς βιοδείκτες. (Chaitanu Wong, και συν., 2023)

2.3.2.6.1 Δομικοί βιοδείκτες

Έρευνες που διεξάχθηκαν από τους Kalló et al. και από τους Gijis et al. αναφέρουν ότι η αλλαγή στα συστατικά του πρωτεώματος των δακρύων έχει ευαισθησία 81% και ειδικότητα 77% για την ανίχνευση AD όπως και η παρουσία αυξημένων επιπέδων του αμυλοειδούς Αβ 42 και ολικής Ταυ δηλώνουν την εμφάνιση της νόσου AD. Τα επίπεδα του Αβ42 και του T-tau σε δακρυϊκά υγρά σε ασθενείς με AD ήταν πολύ αυξημένα. Στην προηγούμενη ενότητα αναφέρθηκε ότι τα MiRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο. Αξιοσημείωτο είναι ότι στα δάκρυα τα συνολικά επίπεδα MiRNA είναι υψηλότερα στους ασθενείς με AD. Οι ασθενείς με AD λόγω του εκφυλισμού του πυρήνα Edinger-Westphal έχουν χαμηλά επίπεδα ακετυλοχολίνης (ACh) και συνεπώς ανωμαλίες στο σύστημα της κόρης. (Chaitanu Wong, et al., 2023) Ο αμφιβληστροειδής του ματιού είναι από τους πιο βασικούς διαγνωστικούς οφθαλμικούς βιοδείκτες διότι αποτελεί ένας μέρος του νευρικού συστήματος με δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τον εγκέφαλο. Στο πρώιμο στάδιο της νόσου ανακαλύφθηκε συσσώρευση βήτα πλακών αμυλοειδούς στα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς (RGCs) με αποτέλεσμα σοβαρό εκφυλισμό των γαγγλιακών κυττάρων και λέπτυνση των στιβάδων των νευρικών ινών του αμφιβληστροειδούς. Επιπροσθέτως οι ασθενείς εμφανίζουν αγγειακά προβλήματα λόγω της συσσώρευσης Αβ πλακών επηρεάζοντας έτσι την αγγειακή ροή αίματος στους ιστούς του εγκεφάλου. Για την απεικόνισή των αγγείων και της διατομής του αμφιβληστροειδούς χρησιμοποιείται η οπτική τομογραφία συνοχής (OCT) και η αγγειογραφία οπτικής συνοχής (OCTA), αντίστοιχα, που επιτρέπουν τον μη επεμβατικό έλεγχο. Μια έρευνα έδειξε μειωμένο στρώμα νευρικών ινών αμφιβληστροειδούς RNFL στο ανώτερο τεταρτημόριο στα άτομα με Alzheimer και MCI. (Klyucherev, και συν., 2022)

2.3.2.6.2 Λειτουργικοί βιοδείκτες

Στην ομάδα των λειτουργικών οφθαλμικών βιοδεικτών ανήκουν οι σακκαδικές οφθαλμικές κινήσεις, η στερεόπτωση (η αντίληψη που διαθέτει κάποιος να αναγνωρίσει την απόσταση μεταξύ των αντικειμένων) και η οπτική οξύτητα. Στους ασθενείς με AD παρουσιάζεται ανώμαλες οφθαλμικές κινήσεις όπου οι σακκαδικές είναι κατεστραμμένες με αποτέλεσμα τα μάτια να μην κινούνται ή να κινούνται καθυστερημένα ως απάντηση στα ερεθίσματα (αφή, ακοή,...κ.α.). Το μετωπιαίο οφθαλμικό πεδίο και ο ραχιαίος προμετωπιαίος φλοιός συνδέονται με τα νευρωνικά δίκτυα που είναι υπεύθυνα για τη μνήμη και τις σακκαδικές κινήσεις, οι οποίες έχουν υποστεί βλάβη ως αποτέλεσμα της μετωπιαίας δυσλειτουργίας. Αντίστοιχα οι ασθενείς με AD εμφανίζουν λιγότερη στερεόπτωση και αυτό οφείλεται στη κακή οπτικοχωρική λειτουργία του εγκεφάλου.. Έτσι οι σακκαδικές οφθαλμικές κινήσεις και η οπτική οξύτητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για το πρώιμο στάδιο της νόσου Alzheimer ενώ η στερεόπτωση ως μια τεχνική διάγνωση. (Chaitanu Wong, και συν., 2023)

Γενικά θα πρέπει να αναφερθεί ότι η χρήση οφθαλμικών βιοδεικτών για την διάγνωση ασθένειας του Alzheimer δεν θα πρέπει να είναι καθοριστική διότι οι εκφυλιστικές αλλαγές συνδέονται και με άλλες ασθένειες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

3.1. Προκλήσεις και προβλήματα στην επικύρωση των βιοδεικτών

Όπως είδαμε οι βιοδείκτες αίματος έχουν το πλεονέκτημα ότι η ανάλυση τους γίνεται μη επεμβατικά και γρήγορα σε διαγνωστικά κέντρα με τα αρχικά αποτελέσματα να είναι έμπιστα, ωστόσο εξακολουθούν να υπάρχουν αμφιβολίες και αρκετοί περιορισμοί με αποτέλεσμα οι βιοδείκτες αίματος να μην μπορούν να χρησιμοποιηθούν επαρκώς για την διάγνωση της νόσου Alzheimer. Εντοπίστηκαν διάφορα προβλήματα κατά την αναφορά των μελετών στην επικύρωση των αποτελεσμάτων για τους βιοδείκτες. Ουσιαστικά, ο ανεπαρκής αριθμός ασθενών, οι συνεχείς αλλαγές στον τρόπο σχεδιασμού της μελέτης, η ασυνέπεια στην επεξεργασία των δεδομένων και οι διαφορετικοί πληθυσμοί ασθενών ως προς την ηλικία και το φύλο προκάλεσαν προβλήματα στο στάδιο της κλινικής ανάλυσης της νόσου Alzheimer. Ένας βασικός τρόπος για την αντιμετώπιση των προβλημάτων είναι να αυξηθεί ο πληθυσμός των ατόμων στις κλινικές δοκιμές έτσι ώστε να αποτελέσματα να καθιστούν έμπιστα. Επίσης

η εναρμόνιση της διαδικασίας κατά την δειγματοληψία, την ανάλυση και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών μεθόδων. Συμπερασματικά όλοι οι παραπάνω βιοδείκτες εμφανίζουν πολλούς περιορισμούς με βασικότερο την ετερογένεια των αποτελεσμάτων. Απαιτούνται επομένως μεγαλύτερες κλινικές μελέτες που θα οδηγήσουν σε πιο αξιόπιστες μεθόδους αξιοποίησης των βιοδεικτών είτε μεμονωμένων είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους αλλά με διάφορες απεικονιστικές μεθόδους.

3.2 Συμπεράσματα

Σε γενικές γραμμές έχουν ανακαλυφθεί ποικίλες μορφές βιοδεικτών καθώς η ιατρική συνεχίζει την έρευνα των βιοαναλυτικών και απεικονιστικών εργαλείων για τον προσδιορισμό στην προκαταρκτική φάση, στην διάγνωση αλλά και στην διαφοροποίηση της AD από άλλες γνωστικές βλάβες και νευροεκφυλιστικές καταστάσεις. (Varesi A, 2022) Πλέον τα σύγχρονα ερευνητικά όργανα βοηθάνε λόγω της ευαισθησίας τους, την ανίχνευση της νόσου ακόμη και με τη μέθοδο εξέτασης αίματος. Η πιο έγκυρη στρατηγική είναι η χρήση συνδυασμού βιοδεικτών έτσι ώστε να αυξάνεται η ακρίβεια και η ειδικότητα της διάγνωσης. Ένας έγκυρος τρόπος είναι χρησιμοποιώντας δείκτες σε πραγματικό χρόνο για την παρακολούθηση της επίδρασης των θεραπειών ως προς την νόσο σε κλινικές δοκιμές όπως για παράδειγμα συνδυασμός πολλών miRNAs. Τα miR-125b, miR-146a, miR-9 και miR-103 που βρίσκονται περισσότερο στο αίμα έχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα σε μελέτες για την διάγνωση της νόσου. Βιοδείκτες του πλάσματος όπως είναι Aβ40, Aβ42, P-Tau και κυτοκίνες έχουν χρησιμοποιηθεί ως κατευθυντήρια μέσα για την επίβλεψη και παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου. Αξιοσημείωτη είναι η περαιτέρω ανάγκη να γίνει πιο κατανοητή η συσχέτισή μεταξύ των επιπέδων των βιοδεικτών, τον τρόπο ζωής του ασθενούς, της παθοφυσιολογίας της AD συμπεριλαμβανομένης και της γνωστικής εξασθένησης. Η έρευνα συνεχίζεται για τον εντοπισμό νέων βιοδεικτών οι οποίοι μειώνουν το κόστος της διαχείρισης της νόσου και την βελτίωση κλινικών δοκιμών.

Βιβλιογραφία

- (χ.χ.). Ανάκτηση από www.ninds.nih.gov:https://health-information/public-education/brain-basics/brain-basics-know-your-brain
- Agnello L, L. S. (2021). *Neurogranin as a Reliable Biomarker for Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease*.
- Amakiri N, K. A. (2019). *Amyloid Beta and MicroRNAs in Alzheimer's Disease*.
- Andrew D. Penman, G. E. (2014). *MicroRNA expression as an indicator of tissue toxicity*.
- Angiulli, F., Conti, E., Zoia, C., Da Re, F., Appollonio, I., Ferrarese, C., & Tremolizzo, L. (2021). *Blood-Based Biomarkers of Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: A Central Role for Periphery*.
- Ansari, A., Maffioletti, E., Milanesi, E., Marizzoni, M., Frisoni, G., Blin, O., & al., e. (2019). miR-146a and miR-181a are involved in the progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*, σσ. 82:102–109. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.06.
- Banzhaf-Strathmann, J., Benito, E., May, S., Arzberger, T., Tahirovic, S., Kretschmar, H., & al., e. (2014). MicroRNA-125b induces tau hyperphosphorylation and cognitive deficits in Alzheimer's disease. . *EMBO J.*, σσ. 33(15):1667–1680. doi: 10.15252/embj.201387576.
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). *Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. Molecules*.
- Chaitanuwong, P., Singhanetr, P., Chainakul, M., Arjkonharn, N., Ruamviboonsuk, P., & Grzybowski, A. (2023). *Potential Ocular Biomarkers for Early Detection of Alzheimer's Disease and Their Roles in Artificial Intelligence Studies*.
- Chen, J., Dai, A., Tang, H., Lu, C., Liu, H., Hou, T., . . . Wei, N. (2022). *Increase of ALCAM and VCAM-1 in the plasma predicts the Alzheimer's disease*.
- Chen, L., Niu, X., Wang, Y., Lv, S., Zhou, X., Yang, Z., & Peng, D. (2022). *Plasma tau proteins for the diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease:*.
- Cooper, Y., Nachun, D., Dokuru, D., Yang, Z., Karydas, A., Serrero, G., . . . Boxer AL, M. B. (2018). *Progranulin levels in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment*.
- Fehlmann, T., Lehallier, B., Schaum, N., Hahn, O., Kahraman, M., Li, Y., & al, e. (2020). Common diseases alter the physiological age-related blood microRNA profile. . *Nat Commun.* , σσ. 11(1):5958. doi: 10.1038/s41467-020-19665-1.
- Forero, D., Gonzalez-Giraldo, Y., Castro-Vega, L., & Barreto, G. (2019). qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *Biotechniques.*, σσ. 67(4):192–199. doi: 10.2144/btn-2019-0065.
- Galimberti, D. V. (2014). *Circulating miRNAs as potential biomarkers in Alzheimer's disease.* .
- Ge, M., Zhang, J., Chen, S., Huang, Y., Chen, W., He, L., & Zhang, Y. (2022). *Role of Calcium Homeostasis in Alzheimer's Disease. Neuropsychiatr Dis Treat*.
- Giacomucci, G., Mazzeo, S., Bagnoli, S., Ingannato, A., Leccese, D., Berti, V., . . . Nacmias, B. (2022). *Plasma neurofilament light chain as a biomarker of Alzheimer's disease in Subjective Cognitive Decline and Mild Cognitive Impairment*.

- Habtemariam, S. (2019). *Natural Products in Alzheimer's Disease Therapy*.
<https://www.doctorhomecare.gr>. (χ.χ.). Ανάκτηση από <https://www.doctorhomecare.gr/nosos-alzheimer/>: <https://www.doctorhomecare.gr/nosos-alzheimer/>
- <https://www.nia.nih.gov>. (χ.χ.). Ανάκτηση από <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-treatment/how-alzheimers-disease-treated>: <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-treatment/how-alzheimers-disease-treated>
- Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., . . . Siemers, E. (2018). *Toward a biological definition of Alzheimer's disease. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*.
- Jayaswamy, P. K., Vijaykrishnaraj, M., P. P., Alexander, L. M., Kellarai, A., & Shetty, P. (2023). *Implicative role of epidermal growth factor receptor and its associated signaling partners in the pathogenesis of Alzheimer's disease*.
- Kappel, A., & Keller, A. (2017). miRNA assays in the clinical laboratory: workflow, detection technologies and automation aspects. . *Clin Chem Lab Med*, σσ. ;55(5):636–647. doi: 10.1515/cclm-2016-0467.
- Kayano, M., Higaki, S., Satoh, J., Matsumoto, K., Matsubara, E., Takikawa, O., & al., e. (2016). Plasma microRNA biomarker detection for mild cognitive impairment using differential correlation analysis. *Biomark Res.* , σσ. 4:22. doi: 10.1186/s40364-016-0076-1.
- Kelley, K. W. (2022). *Human brain organogenesis: Toward a cellular understanding of development and disease*.
- Kelley, K. W., & Pasca, S. P. (2022). *Human brain organogenesis: Toward a cellular understanding of development and disease*.
- Khalil, M. T. (2018). *Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders*.
- Khan, S., Barve, K., & Kumar, M. (2020). *Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. Curr Neuropharmacol*.
- Klyucherev, T., Olszewski, P., Shalimova, A., Chubarev, V., Tarasov, V., Attwood, M., . . . Schiöth, H. (2022). Advances in the development of new biomarkers for Alzheimer's disease. . *Transl Neurodegener. Apr 21;11(1):25*. doi: 10.1186/s40035-022-00296.
- Kumar, A., Sidhu, J., Goyal, A., & al., e. (2022). *Alzheimer Disease*.
- Ludwig, N., Fehlmann, T., Kern, F., Gogol, M., Maetzler, W., Deutscher, S., & al., e. (2019). Machine learning to detect Alzheimer's disease from circulating non-coding RNAs. . *Genomics Proteomics Bioinformatics*, σσ. 17(4):430–440. doi: 10.1016/j.gpb.2019.09.004.
- Maffioletti, E., Tardito, D., Gennarelli, M., & Bocchio-Chiavetto, L. (2014). Micro spies from the brain to the periphery: new clues from studies on microRNAs in neuropsychiatric disorders. . *Front Cell Neurosci*. 2014;8:75.
- Majeed, A., Marwick, B., Yu, H., Fadavi, H., & Tavakoli, M. (2021). *Ophthalmic Biomarkers for Alzheimer's Disease*.

- Michno, W., Nyström, S., Wehrli, P., Lashley, T., Brinkmalm, G., Guerard, L., . . . Zetterberg, H. H. (2019). *Pyroglutamation of amyloid-βx-42 (Aβx-42) followed by Aβ1-40 deposition underlies plaque polymorphism in progressing Alzheimer's disease pathology.*
- Mielke, M., Syrjanen, J., Blennow, K., Zetterberg, H., Vemuri, P., Skoog, I., . . . Kern, S. (2019). *Plasma and CSF neurofilament light: Relation to longitudinal neuroimaging and cognitive measures.*
- Nakamura, A., Kaneko, N., Villemagne, V. L., Kato, T., Doecke, J., Doré, V., . . . Yanagisawa, K. (2018). *High performance plasma amyloid-β biomarkers for Alzheimer's disease.*
- O'Bryant, S., Mielke, M., Rissman, R., Lista, S., Vanderstichele, H., Zetterberg, H., & al., e. (2017). Blood-based biomarkers in Alzheimer disease: current state of the science and a novel collaborative paradigm for advancing from discovery to clinic. . *Alzheimers Dement.* 2017;13(1):45–58. doi: 10.1016/j.jalz.2016.09.014. .
- Olivares D, D. V. (2012). *N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor antagonists and memantine treatment for Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease.* *Curr Alzheimer Res.*
- Ossenkoppele, R., & Hansson, O. (2021). Towards clinical application of tau PET tracers for diagnosing dementia due to Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2021;17:1998–2008. doi: 10.1002/alz.12356.
- Palmqvist, S., Scholl, M., Strandberg, O., Mattsson, N., Stomrud, E., Zetterberg, H., & al., e. (2017). Earliest accumulation of beta-amyloid occurs within the default-mode network and concurrently affects brain connectivity. . *Nat Commun.* 2017.
- Pogue, A., Cui, J., Li, Y., Zhao, Y., Culicchia, F., & Lukiw, W. (2010). Micro RNA-125b (miRNA-125b) function in astrogliosis and glial cell proliferation. . *Neurosci Lett.* , σσ. 476(1):18–22. doi: 10.1016/j.neulet.2010.03.054. .
- Roberts, R., Aakre, J., Cha, R., Kremers, W., Mielke, M., Velgos, S., . . . Petersen, R. (2015). *Association of Pancreatic Polypeptide with Mild Cognitive Impairment Varies by APOE ε4 Allele.*
- Romano, R., & Bucci, C. (2020). *Role of EGFR in the Nervous System.*
- Saunders, T., Gunn, C., Blennow, K., Kvartsberg, H., Zetterberg, H., Shenkin, S. D., . . . Spires-Jones, T. (2023). *Neurogranin in Alzheimer's disease and ageing: A human post-mortem study.* *Neurobiology of disease.*
- Selkoe, D. J. (2001). *Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy.*
- Sen Liu a b c, M. F. (2022). *MicroRNAs in Alzheimer's disease: Potential diagnostic markers and therapeutic targets.*
- Shibi Muralidar, S. V. (2020). *Role of tau protein in Alzheimer's disease: The prime pathological player.*
- Silvestro, S., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2019). Role of miRNAs in Alzheimer's disease and possible fields of application. . *Int J Mol Sci.* 2019;20(16):3979. doi: 10.3390/ijms20163979. .
- Tong, B. C., Wu, A. J., Li, M., & Cheung, K. H. (2018). *Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies.* *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research.*
- Tönnies, E., & Trushina, E. (2017). *Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease.* *J Alzheimers Dis.*

- Varesi A, C. A. (2022). *Blood-Based Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis and Progression: An Overview*.
- Verma, M., Wills, Z., & Chu, C. (2018). *Excitatory Dendritic Mitochondrial Calcium Toxicity Implications for Parkinson's and Other Neurodegenerative Diseases*. *Front Neurosci*.
- Villa, C., & Stoccoro, A. (2022). *Epigenetic Peripheral Biomarkers for Early Diagnosis of Alzheimer's Disease*. *Genes (Basel)*.
- Wang, J., Chen, C., & Zhang, Y. (2020). An investigation of microRNA-103 and microRNA-107 as potential blood-based biomarkers for disease risk and progression of Alzheimer's disease. *J Clin Lab Anal*, σ. 34(1):e23006. .
- West, R. L., Lee, J. M., & Maroun, L. E. (1995). *Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient*. *Journal of molecular neuroscience*.
- Xie, B., Zhou, H., Zhang, R., Song, M., Yu, L., Wang, L., & al, e. (2015). Serum miR-206 and miR-132 as potential circulating biomarkers for mild cognitive impairment. . *J Alzheimers Dis*, σσ. 45(3):721–731. doi: 10.3233/JAD-142847.
- Xin-Tong, S., Li-Qiong, W., Jin-Ling, L., Na, Z., Lu, W., Guang-Xia, S., . . . Cun-Zhi, L. (2020). *Neurogranin: A Potential Biomarker of Neurological and Mental Diseases*.
- Zetterberg, H., Mörtberg, E., Song, L., Chang, L., Provuncher, G., Patel, P., & al, e. (2011). Hypoxia due to cardiac arrest induces a time-dependent increase in serum amyloid β levels in humans. . *PLoS One*, σ. 6(12):e28263. doi: 10.1371/journal.pone.0028263. .
- Zhang M, B. Z. (2021). *Alzheimer's Disease and microRNA-132: A Widespread Pathological Factor and Potential Therapeutic Target*. *Front Neurosci*.

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.