

NASTANEK, RAZVOJ IN DIAGNOSTIKA ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

ETIOPATHOGENESIS AND DIAGNOSTICS OF ALZHEIMER'S DISEASE

AVTOR / AUTHOR:

Andreja Emeršič, mag. farm.^{1,2},
prof. dr. Zvezdan Pirtošek, dr. med., spec.¹

¹ Laboratorij za kognitivno nevroznanost, Klinični
oddelek za bolezni živčevja, Nevrološka klinika,
Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška 2,
1000 Ljubljana

² Entrapharm d.o.o., Pot k sejmišču 30,
1231 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: andreja.emersic@entrpharm.com

POVZETEK

Alzheimerjeva bolezen je progresivna nevrodegenerativna bolezen, ki postopoma vodi v upad spominskih in drugih intelektualnih sposobnosti, vedenjske motnje in spremembe osebnosti. Je najpogostejši vzrok za demenco, ki postaja zaradi staranja populacije vse večji socialni in tudi ekonomski problem. Trenutno je v Evropi več kot 6 milijonov bolnikov z demenco, od tega jih ima več kot polovica Alzheimerjevo bolezen. Kljub pomembnim doprinosom k razumevanju patogeneze, biološke osnove Alzheimerjeve bolezni še niso v celoti pojasnjene. Ker proti A β usmerjene učinkovine v kliničnih raziskavah ne izkazujejo želene učinkovitosti, se pojavljajo pomisleki o ustreznosti prevladujoče hipoteze o amiloidni kaskadi. Medtem ko se ugiba o novih in dodatnih vzrokih za nastanek bolezni, lahko vpeljava bioloških označevalcev, ki omogočajo zgodnejšo postavitev diagnoze Alzheimerjeve bolezni, izboljša zasnovu prihajajočih kliničnih študij.

KLJUČNE BESEDE:

Alzheimerjeva bolezen, etiologija, amiloidni peptid beta, diagnoza, biološki označevalci

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that gradually leads to decline in memory and other intellectual functions, changes in personality and behavioral disturbances. With a rapidly aging population in the developed world dementia caused by Alzheimer's disease is becoming a growing social and economic problem. In Europe, the estimated number of patients who have dementia is over 6 million and more than half of these patients have Alzheimer's disease. Despite major progress has been made in our understanding of the underlying pathogenesis, the biological basis of AD is still not fully understood. As failures of compounds targeting amyloid beta in clinical trials are repeatedly reported, the prevailing amyloid cascade hypothesis is being questioned in terms of its causality. Other also plausible etiologies are arising meanwhile new drugs are already urgently needed. Since biomarkers for the pathophysiological process of AD enable early diagnosis and patient stratification, they may be of great value in clinical trial design.

KEY WORDS:

Alzheimer's disease, etiology, amyloid beta peptide, diagnosis, biomarkers



1 UVOD

Alzheimerjeva bolezen (AB) je kronična in počasi napredujoča neurodegenerativna bolezen, za katero trpijo milijoni ljudi po svetu. Postopoma vodi v upad spominskih in drugih intelektualnih sposobnosti, vedenjske motnje in spremembe osebnosti. Je najpogostejši in najbolj intenzivno raziskovan vzrok demence (1, 2). Sindrom demence glede na evropske epidemiološke raziskave prizadene 1 od 20 ljudi nad 65 letom starosti. Pred tremi leti je bilo število starostnikov z demenco v Evropi ocenjeno na 6,3 milijona, pri čemer naj bi se letna incidenca gibala blizu 1 milijona. Več kot polovica teh bolnikov ima Alzheimerjevo demenco. Brez pomembnega napredka v preprečevanju in zdravljenju bolezni je v prihodnje pričakovati, da bodo te številke zaradi staranja prebivalstva skokovito narasle. Ob tem so Alzheimerjeva in druge oblike demenc že zdaj četrte po vzrokih smrti v razvitih državah (3-5). Kljub obsežnim raziskovalnim prizadevanjem in številnim doprinosom k razumevanju patogeneze v zadnjih desetletjih, biološke osnove AB še niso v celoti pojasnjene, bolezen pa ostaja neozdravljiva (4).

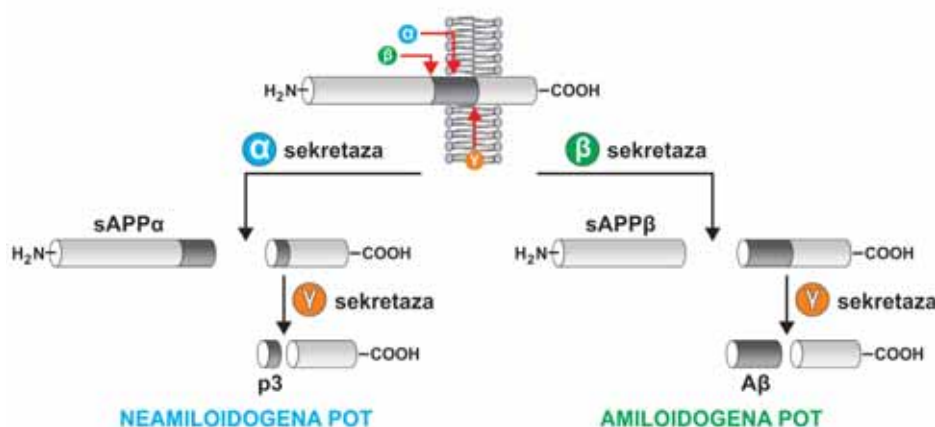
ška znamenja Alzheimerjeve bolezni. Post mortem ugotovljena prisotnost le-teh še vedno predstavlja definitivni kriterij za postavitev diagnoze bolezni (7).

2.1 SENILNE LEHE

So degenerativna žarišča izven nevronov in v okolici možganskih žil, ki imajo v središču amiloidne odlage, v obrobju pa distrofične nevrite in dendrite ter aktivirane astrocite in mikroglijo (8). Njihovo amiloidno jedro sestavlja pretežno amiloidni peptid beta ($A\beta$), ki nastaja s proteolitično cepitvijo transmembranskega proteina – amiloidnega prekursorjskega proteina (APP). APP se sintetizira v nevronih in celicah glije, njegovo proteolitično cepitev pa katalizirajo proteaze, imenovane α -, β - in γ -sekretaze. Z zaporednim delovanjem α - in γ -sekretaze nastajajo neamiloidogeni produkti, saj α -sekretaza katalizira cepitev APP znotraj regije $A\beta$. $A\beta$ nastaja le kadar na APP najprej deluje β -sekretaza, ki odcepi sAPP β tako, da novonastali N-terminalni konec preostalega fragmenta C99 ustreza prvi aminokislinski peptida $A\beta$. Encimski kompleks γ -sekretaza nato cepi fragment C99 med aminokislinskimi ostanki 38-43, zaradi česar po tej *amiloidogeni* poti nastajajo peptidi $A\beta$ različnih dolžin (slika 1). Količinsko je med njimi najbolj zastopan $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ je le 10 %. Kljub temu ravno slednji prevladuje v zunajceličnih amiloidnih odlagah, najverjetneje zato, ker je ta oblika bolj hidrofobna in zato bolj nagnjena k agregaciji in tvorbi fibril (9,10). Čeprav $A\beta_{42}$ primarno povezujejo z zunajceličnimi odlagami, se je v zadnjem desetletju zbralo tudi precej dokazov o njegovi znotrajcelični akumulaciji. Na transgenih živalskih modelih AB so pokazali, da lahko znotrajcelični $A\beta$ vpliva na delovanje sinaps, posledično pa tudi na učenje in spomin (10).

2 SPREMEMBE V MOŽGANIH

Alois Alzheimer je leta 1906 prvi povezal klinično sliko pokojne dementne bolnice s pri obdukciji odkritimi nepravilnostmi v možganih (6). Od takrat pa vse do danes so senilne lehe in neurofibrilarne pentlje ključna nevropatolo-



Slika 1: Procesiranje amiloidnega prekursorjskega proteina (APP) po neamiloidogeni (levo) in amiloidogeni (desno) poti.

Figure 1: Proteolytic processing of APP within the anti-amyloidogenic (left) and amyloidogenic (right) pathways.



2.2 NEVROFIBRILARNE PENTLJE

So sestavljene iz parnih, vijačno zvitih nevrofilamentov hiperfosforiliranega proteina tau. Tau v normalnih nevronih povezuje tubulin v nevrotubule, ki so pomembni za akso-plazemski transport snovi. Zaradi zvečane aktivnosti kinaze proteina tau prihaja do čezmernega fosforiliranja tega proteina, ki zatem ni več vezan na mikrotubule, temveč leži prosto v citosolu (11,12). K zvečani aktivnosti kinaze proteina tau naj bi prispeval tudi A β , čeprav časovna in prostorska povezava med senilnimi lehami in nevrofibrilarnimi pentljami ni dobro pojasnjena. Opazili so namreč, da naj bi se zunajcelični A β pričel odlagati v frontalnem korteksu in se nato razširil po celotni skorji, medtem ko se nevrofibrilarne pentlje najprej pojavijo v limbičnem sistemu (entorinalna skorja, hipokampus, dentatni girus) in šele nato v skorji (11, 13). Kljub temu, da so nevrofibrilarne pentlje značilna znotrajcelična sprememba (opazne v perikarionu nevronov ter v distrofičnih nevrutih in dendritih senilnih leh), lahko po odmrtnosti nevronov ostanejo še nekaj časa v zunajceličnem prostoru. Ker odmirajo tudi nevroni brez nevrofibrilarnih pentelj, še ni jasno, ali so vzrok ali posledica neurodegenerativnega procesa (12, 14).

2.3 ANATOMSKE IN BIOKEMIČNE SPREMEMBE

Poleg senilnih leh in nevrofibrilarnih pentelj se v možganih bolnikov z AB pojavljajo še druge strukturne in funkcionalne spremembe, vključno z vnetnim odzivom in oksidativnim stresom (10). Skupna posledica vseh patoloških dejavnikov je znatno prizadeto delovanje nevronov in sinaps ter njihovo obsežno propadanje. Izginjanje specifičnih nevronov se odraža v biokemičnih spremembah kot so npr. znižana koncentracija receptorjev za glutamat v možganski skorji (zaradi propada piramidnih celic) ter upadanje aktivnosti holin-acetiltransferaze in posledično znižana koncentracija acetilholina v hipokampusu in možganski skorji (zaradi propada holinergičnih nevronov). Propadanje nevronov vodi sčasoma tudi v anatomske spremembe – značilna je izrazita atrofija možganovine v asociacijskih predelih možganske skorje (v temporalnem, frontalnem in parietalnem režnju) ter razširitev stranskih ventriklov. V času smrti so lahko možgani bolnikov z AB tudi za tretjino lažji od možganov ne-dementnih posameznikov enake starosti (10,12).

3 ETIOPATOGENEZA

Kaj točno je vzrok za nastanek AB je še vedno predmet razprav. Le za 3-5 % vseh primerov AB vemo, da so vzrok zanj mutacije v genih, ki se dedujejo avtosomno dominantno. V teh primerih govorimo o družinski obliki AB oz. obliki z zgodnjim začetkom (med 45. – 65. letom starosti). Mutacije v genu za APP ali genih za preseniline (PSEN1 ali PSEN2), ki so katalitična jedra encimskega kompleksa γ -sekretaze, pogosto vodijo v spremenjeno procesiranje APP tako, da nastaja celokupno več A β ali le več daljših oblik (A β 42) tega peptida (12,13). Precej bolj pogosta sporadična oblika bolezni nastopi po 65. letu starosti in ni vzročno povezana z mutacijami v genih, čeprav tudi v teh primerih ne moremo povsem zanemariti genetskih dejavnikov. Znano je na primer, da imajo nosilci alela *ApoE4* večje tveganje za pojav AB, poleg tega pri njih bolezen nastopi 5 – 10 let prej. Homozigoti za *ApoE4* imajo po 85. letu starosti ~ 60 % tveganje za nastanek AB, kar je približno dvakrat več kot posamezniki z eno kopijo tega alela; pri *ApoE3* homozigotih je to tveganje 10 % (13, 15). Izvzemajoč starost ob nastopu bolezni imata sporadična in družinska oblika AB podobne značilnosti – nevrološke in histopatološke. Od tod izhaja tudi predpostavka, da je možno z amiloidnimi odlagami razložiti patogenezo obeh oblik bolezni. Spoznanja o družinski AB so v začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja botrovala oblikovanju hipoteze o amiloidni kaskadi, ki ima v nekoliko posodobljeni obliki, še danes veliko zagovornikov (13, 16, 17).

3.1 HIPOTEZA AMILOIDNE KASKADE

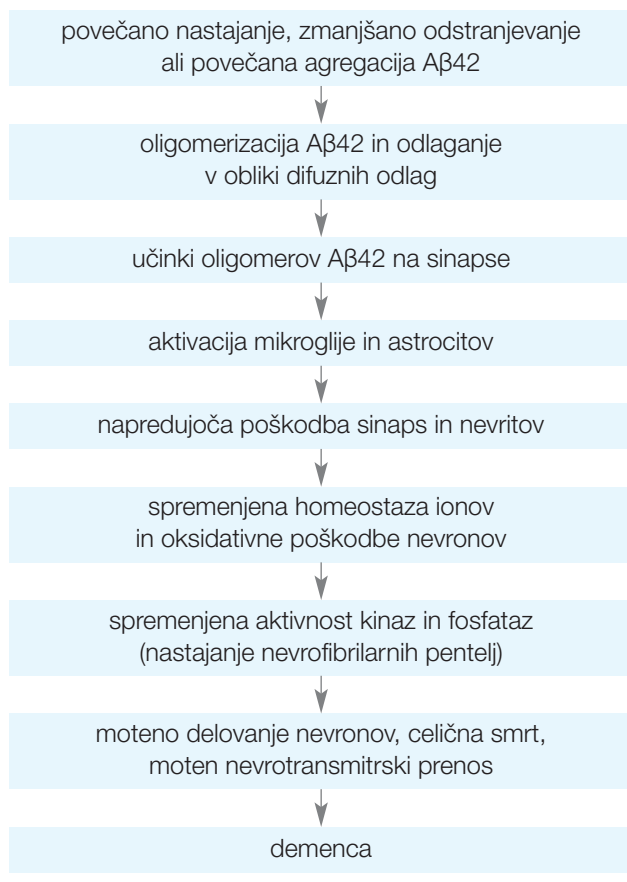
Hipoteza amiloidne kaskade pravi, da je vzrok za nastanek AB povečano nastajanje ali zmanjšano odstranjevanje A β . Izvorno so predpostavljali, da akumulacija hidrofobnega A β vodi v njegovo agregacijo in nastajanje netopnih leh v možganih, te pa nato sprožijo sosledje škodljivih sprememb (vključno s tvorbo znotrajceličnih nevrofibrilarnih pentelj), ki se odražajo v odmiranju nevronov oz. klinično v kognitivnem upadu (13, 16). Kasneje se je izkazalo, da breme senilnih leh ne korelira dobro s spominskim upadom, prav tako so s slikovnimi metodami ugotovili, da so zunajcelične amiloidne odlage prisotne tudi pri kognitivno ohranjenih posameznikih. Hkrati se pri mnogih mišjih modelih AB spominske težave nakazujejo še preden je v njihovih možganih opaziti lehe (13, 17). Ker prisotnost amiloidnih leh ne pomeni nujno tudi spominskih deficitov je torej možno, da te niso vzrok temveč le posledica oz. sekundarni znak nevro-

degenerativnega procesa. Zato sedaj predvidevajo, da lahko omenjeno zaporedje dogodkov izzovejo druge oblike A β – npr. znotrajcelične odlage amiloida, spremenjeno razmerje med A β 42/A β 40 in predvsem topni agregati peptida, t. j. oligomerne zvrsti A β (slika 2).

Topni oligomeri A β naj bi bolje korelirali s stopnjo AB, čeprav njihova struktura, velikost, konformacija in medsebojno razmerje z drugimi amiloidnimi agregati ni natančno opredeljeno (13, 18). Nevrotoksične učinke naj bi posredo-

Slika 2: Posodobljena hipoteza o amiloidni kaskadi predvideva, da je vzrok za nastanek družinske in sporadične oblike Alzheimerjeve bolezni prekomerno kopičenje A β 42. Z agregacijo A β 42 se sproži kaskada dogodkov, ki postopoma vodijo v nevrološke simptome Alzheimerjeve bolezni.

Figure 2: The amyloid cascade hypothesis explains the origins of Alzheimer's disease. Both familial forms of Alzheimer's and later-onset forms with no known etiology (sporadic AD) lead to the production of excess A β 42. Once this toxic peptide begins to aggregate, a cascade of events is triggered that produces the neurological symptoms of Alzheimer's disease.



vali preko različnih receptorjev (receptorja za nevronske rastni dejavniki – NGFR, NMDA receptorja, inzulinskega receptorja, celičnega prionskega proteina – PrP^C), lahko da zato, ker so tako raznoliki ali ker so enostavno bolj »lepljivi« – imajo detergentom podobne lastnosti. Poleg tega, da vplivajo na znotrajcelično signaliziranje naj bi povečali tudi prepustnost celičnih membran ter tako okvarili homeostazo ionov, z vstopanjem v celice (preko internalizacije receptorjev) in znotrajcelično akumulacijo pa naj bi prizadeli številne celične procese – delovanje proteosoma, mitohondrijev, nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti, avtofagijo (18). Iz možganov bolnikov z AB so *post mortem* izolirali različne oligomerne zvrsti A β . Za dimere A β , izolirane iz njihovega likvorja, so pokazali, da učinkovito preprečijo dolgoročno potenciacijo (*ang. long-term potentiation*) v hipokampusu, in to v pikomolarnem območju (13). Dokazi iz genskih študij, histopatoloških pregledov možganov ter poskusov na celičnih in živalskih modelih tako v dobršni meri podpirajo posodobljeno hipotezo o amiloidni kaskadi, a vseeno niso tako neizpodbitni, da bi bila vsesplošno sprejeta (preglednica 1) (7, 13, 19).

3.2 ALTERNATIVNE HIPOTEZE

Poleg vodilne hipoteze o amiloidni kaskadi poskušajo patologijo AB pojasniti (ali vsaj dopolniti) tudi druge neodvisne razlage (preglednica 2). Glavno konkurenco amiloidni predstavlja naslednja najbolj dovršena hipoteza o vzročni povezanosti s hiperfosforiliranim proteinom tau (18, 19). Nekatere od alternativnih hipotez obravnavajo na primer še vpletenost okolijskih dejavnikov (kot so porast izpušnih plinov v ozračju, stres, prehrana, prekomerna uporaba antibiotikov, odsotnost intelektualne aktivnosti) in spremljajočih tkivnih poškodb, ki so povezane s procesom staranja, vnetjem, aktivacijo prirojenega imunskega sistema in oksidativnim stresom v osrednjem živčevju. Zaključek ameriškega Nacionalnega inštituta za zdravje (*angl. NIH- National Institute for Health*), ki je leta 2010 izvedel pregled literature s tega področja, je sicer bil, da trenutno ni zadostnih in znanstveno oprijemljivih dokazov, ki bi podpirali povezavo med katerikoli *spremenljivim* dejavnikom in znižanim tveganjem za AB (15). Na določeni stopnji je nastajanje A β nedvomno vključeno v razvoj, če že ne nastanek AB (7, 20). Vseeno pa neuspehi, ki jih nizajo klinične raziskave z učinkovinami, usmerjenimi proti A β , silijo h kritičnemu razmišljanju in priznanju, da bo morda potrebno spremeniti dojemanje njene etiologije. Ob tem prihajajo ponovno v ospredje alternativne hipoteze, kakor tudi pogosto spregledano dejstvo, da ima lahko A β tudi določene fiziološke funkcije, saj nastaja pri vseh ljudeh, le da jih večina ne razvije demence (7, 15).

Preglednica 1: Dognanja, ki podpirajo in izpodbijajo hipotezo o amiloidni kaskadi. Hipotezo lahko vrednotimo na 4 nivojih – molekularni genetiki, patologiji, celični biologiji in živalskih modelih (7, 13).

Table 1: Pros and cons for the amyloid cascade hypothesis. Table provides an overview of some of the most important lines of evidence. The hypothesis can be evaluated along four themes - molecular genetics, pathology, cell biology and animal models (7, 13).

	DOGNANJA, KI PODPIRAJO HIPOTEZO	DOGNANJA, KI IZPODBIJAJO HIPOTEZO
MOLEKULARNA GENETIKA	Mutacije v genih APP, PSEN1, PSEN2, ki povzročajo družinsko obliko AB, vodijo v povečano nastajanje Aβ42. Gen APP se nahaja na 21. kromosomu; posamezniki z Downovim sindromom (trisomija 21. kromosoma) s 3 kopijami gena APP izkazujejo znake zgodnje oblike AB. Večina mutacij v APP se nahaja blizu mesta cepitve, ki vodi v nastajanje Aβ. Tiste znotraj fragmenta Aβ naj bi povečale fibrilizacijo Aβ. ApoE4, ki je povezan s povečanim odlaganjem Aβ, je najpomembnejši genetski dejavnik tveganja za pojav sporadične AB.	Družinska oblika AB predstavlja < 5 % vseh primerov bolezni. Mutacije niso dokaz, da je Aβ tudi primarni vzrok bolezni. Mutacije v APP in PSEN lahko povzročijo bolezen preko mehanizmov, ki niso odvisni od Aβ. Povečano nastajanje Aβ42 je le ena od možnih posledic spremenjenega procesiranja APP. Poleg Aβ nastajajo pri proteolitični razgradnji APP tudi drugi potencialno nevrotoksični produkti. ApoE4 ima veliko funkcij, ki niso vezane na Aβ in mehanizem, preko katerega ApoE4 zveča tveganje za AB, ni natančno znan.
PATOLOGIJA	Prisotnost amiloidnih leh je eden od diagnostičnih kriterijev; povezana je s kognitivnim upadom.	~ 30 % zdravih starostnikov ima amiloidne odlage, a ne znakov kognitivnega upada. V primerjavi z nevrofibrilarnimi pentljami razporeditev senilnih leh v možganih slabše korelira s kognitivnimi motnjami, značilnimi za AB. Številne raziskave niso potrdile povezave med demenco in distribucijo ter celokupnim bremenom amiloidnih leh. Ni pokazano, da bi odstranitev senilnih leh ublažila simptome bolezni.
CELIČNA BIOLOGIJA	Pokazana je nevrotoksičnost sinteznega peptida Aβ in proteina tau – Aβ lahko povzroči aktivacijo kinaz, hiperfosforilacijo proteina tau, vnetje, oksidativni stres, in apoptozo nevronov.	Učinki niso tako izraziti, da bi z njimi lahko razložili obsežno propadanje nevronov. Učinke težko prenesemo na pogoje <i>in vivo</i>. V <i>in vitro</i> poskusih večinoma uporabljajo izoliran Aβ42 v koncentracijah, ki so tudi do 1000- krat višje od fizioloških. Glede na hidrofobne lastnosti se Aβ v <i>in vivo</i> pogojih verjetno ne nahaja v prosti obliki temveč vezan na druge hidrofobne proteine. Akutna izpostavitve izoliranemu Aβ ne ponazarja postopnega nalaganja Aβ in nastopa AB.
ŽIVALSKI MODELI	Transgene miši s prekomernim izražanjem APP ali PSEN1 izkazujejo povečano nastajanje Aβ42 in kognitivne motnje. Topni oligomeri Aβ vplivajo na dolgoročno potenciacijo (<i>ang. long-term potentiation</i>) v hipokampusu transgenih mišjih modelov AB.	Prekomerno izražanje APP ni značilno za sporadično obliko AB pri ljudeh. Prekomerno izražanje proteinov lahko povzroči moteno delovanje celic neodvisno od Aβ. Čezmerno nastajanje Aβ velikokrat ne povzroči nastanka nevrofibrilarnih pentelj in atrofije pri transgenih mišjih modelih AB; ker taki modeli ne odražajo tau patologije so kvečjemu modeli amiloidne proteinopatije in ne AB kot take. Motnje v delovanju nevronov so opazili tudi pred pojavom senilnih leh pri živalih.

Preglednica 2: Alternativne hipoteze in dejavniki tveganja za razvoj patologije Alzheimerjeve bolezni.

Table 2: Alternative theories to AD causality. The most advanced alternative hypothesis of tau hyperphosphorylation along with other possible explanations (some more of a risk factor rather than critical underlying mechanism of the disease).

MOŽEN VZROK/ DEJAVNIK TVEGANJA	RAZLAGA
Hiperfosforilacija beljakovine tau	Nevrofibrilarne pentlje so opazne v možganih bolnikov še pred pojavom senilnih leh in v primerjavi s slednjimi bolje korelirajo z opaženim vzorcem atrofije in kognitivnimi simptomi v zgodnji fazi bolezni (7, 15). Aβ posreduje toksične učinke preko proteina tau – le v povezavi z njim so pokazali znatno z Aβ izzvano nevrodegeneracijo (7). Mutacije v genu <i>tau</i> povzročajo avtosomno dominantno frontotemporalno demenco s podobno patologijo kot jo srečamo pri AB, le brez pojava zunajceličnih amiloidnih odlag, kar pomeni, da lahko do nevrodegeneracije prihaja tudi v odsotnosti Aβ (15).
Staranje	Starost je glavni dejavnik tveganja za AB. S staranjem se možgani, kakor tudi preostali organizem, manj uspešno spopadajo z različnimi poškodbami in stresnimi dejavniki. Starostno odvisna hipoteza izhaja iz celične biologije možganov, oslABLJENE zaradi normalnega procesa staranja. Običajen s starostjo povezan kognitivni upad naj bi se prevesil v patofiziologijo AB ob naslednjih zaporednih dogodkih: 1) začetna poškodba tkiva, 2) kronično vnetje in 3) spremenjena celična fiziologija, zaradi katere so celice nagnjene k propadanju. Staranje naj bi predvsem povečalo verjetnost, da homeostatski mehanizmi niso sposobni zaustaviti vnetnega odziva potem, ko je poškodba že odpravljena (7, 22).
ApoE4	Je najpomembnejši genetski dejavnik tveganja za AB. ApoE izločajo predvsem astrociti in celice mikroglije. Ima ključno vlogo pri transportu lipidov možganih, popravljanju poškodovanih nevronov in vzdrževanju sinaptičnih povezav. Z veliko afiniteto veže tudi Aβ izločen iz celic. Izooblika ApoE4 ima v primerjavi z ApoE3 in ApoE2 manjšo afiniteto do Aβ zato je manj učinkovita pri njegovem odstranjevanju in spodbuja njegovo agregacijo (19). ApoE4 je v primerjavi z ApoE3 bolj dovzeten za proteolizo do nevrotoksičnih fragmentov, ki spodbujajo moteno delovanje mitohondrijev, prav tako pa pospešuje hiperfosforilacijo proteina tau (15).
Diabetes	Inzulinska rezistenca in moten metabolizem glukoze sta znan dejavnik tveganja za AB. Inzulin prehaja krvno-možgansko pregrado in vpliva na koncentracijo Aβ42 v likvorju. Inzulinski receptorji se nahajajo v področjih možganov, ki jih pri AB zgodaj zajame proces nevrodegeneracije (hipokampus, entorinalna skorja). Encim IDE (<i>angl. insulin degrading enzyme</i>) je vključen v klirens Aβ iz možganov; Aβ in inzulin sta kompetitivna substrata tega encima. Periferna hiperinzulinemija lahko zmanjša prehajanje inzulina čez hematoencefalno bariero, kar se odraža z znižanimi nivoji inzulina v možganih in zmanjšanim izražanjem IDE. Zaradi zmanjšanih učinkov inzulina na metabolizem Aβ in z inzulinom povezane cerebrovaskularne disfunkcije se v povezavi z AB pojavlja celo pojem »sladkorne bolezni tipa 3«. Možni prekrivajoči mehanizmi sladkorne bolezni in AB so privedli do raziskovanja terapevtskega potenciala nekaterih antidiabetikov v zdravljenju AB (15, 23).
Vnetno-imunski odziv	Vnetje je tudi pri AB dvorezen meč – mikroglija ima primarno nevroprotektivno vlogo (fagocitoza in razgradnja Aβ), a lahko postane sčasoma tudi pretirano dejavna. Morda neprestan stik z Aβ vodi do preklopa fenotipa celic mikroglije, ki so zato manj učinkovite pri odstranjevanju Aβ, neprestano nastajanje kemokinov in vnetnih produktov pa pripomore k napredovanju nevrodegenerativnega procesa (15, 24). Nekatere retrospektivne raziskave so nakazovale, da naj bi jemanje nesteroidnih antirevmatikov zmanjšalo incidenco AB, vendar prospektivne študije dajejo neskladne rezultate. Vnetna komponenta AB pridobiva pomen tudi preko inzulinske rezistence in potencialno vključenih s TNF (<i>angl. tumor necrosis factor</i>) izzvanih vnetnih poti (15).
Infekcije	Proteinopatije, ki jih povezujemo z nevrodegenerativnimi boleznimi, imajo veliko vzporednic s prionskimi boleznimi zato se je pojavila hipoteza, da so lahko morda prionske ali virusne infekcije vzrok AB in drugih nevrodegenerativnih bolezni (14, 15).

Vzrokov, da omenjene spojine v 3. fazi kliničnih študij nimajo želene učinkovitosti, je tako več. Lahko da je poznavanje njihovega mehanizma delovanja nepopolno ali, da so v naslednjo fazo kliničnih raziskav napredovale neprimerne kandidatne spojine. Možno je, da so izbrane tarčne populacije preveč heterogene in vključujejo tudi bolnike, pri katerih morda vzrok za demenco ni AB ali da je pri mnogih od njih bolezen že tako napredovala, da zaradi obsežnega propada nevronov koristi zdravljenja, ki naj bi imelo vpliv na sam potek bolezni, ne moremo opaziti (15, 21). Lahko da toksična oblika Aβ ustvari zanko škodljivih dogodkov, ki se sama vzdržuje tudi po odstranitvi vzroka ali da enkrat sproženega zaporedja škodljivih sprememb enostavno ni več mogoče zaustaviti (13). Enako verjetno pa je seveda tudi, da Aβ ni (edini) vzrok za pogubne dogodke, temveč le eden od enakovrednih dejavnikov, ki vodijo v bolezen ali samo zgodnji odziv na še neznano etiologijo v ozadju oz. nad njim (7, 13). Nobena od trenutno obstoječih hipotez namreč ne razloži v zadostni meri vseh biokemičnih in patoloških posebnosti AB (19).

4 KLINIČNA SLIKA

Zaradi počasi razvijajoče se nevropatologije, se AB kaže kot napredujoča motnja kognitivnih sposobnosti (25). Prva znamenja bolezni so pogosto minimalne spremembe v obnašanju in spretnostih posameznika, ki jih pogosto pripisujemo stresu ali normalnemu staranju. Že zgodaj se pojavijo pozabljivost, upočasnjeno dožemanje, nemir, motnje v presoji in težave pri odločanju, kakor tudi depresivna disforija (pobito počutje) in zmanjšano zanimanje za družbenje oz. socialni umik (25, 26). Prizadetost hipokampusa in holinergične projekcije v hipokampus sčasoma vodi v vse bolj očitne motnje spomina in učenja. Najprej je prizadeto prehajanje kratkoročnega v trajni spomin (14, 25). Spomin na dogodke pred začetkom bolezni je navadno še ohranjen, kažejo pa se izguba spomina za nedavne dogodke (epizodični spomin) in za podatke, ki niso vezani na prostor in čas, kot so npr. splošno znana dejstva (semantični spomin). Čeprav so spominske motnje in težave pri učenju in pomnjenju novih informacij velikokrat najbolj izrazite (amnestična slika), lahko pri nekaterih posameznikih prevladujejo neamnestični znaki, kot so motnje vidno-prostorskih zaznav (slabo oceni npr. razdaljo in hitrost, ima težave pri oblačenju in rokovanju z orodji) in afazija. Značilno je krčenje besedišča (težave z iskanjem pravih besed), zmanjšana besedna tekočnost ter manj natančno izražanje

(25, 26). Bolnik je tudi slabo orientiran v trenutnem času in prostoru (se npr. izgublja, zamenjuje dan in noč), zmanjšana sposobnost načrtovanja, presojanja in organizacije pa mu otežujejo izvajanje zahtevnejših dnevnih opravil (npr. pripravo obrokov). Ko bolezen napreduje se pojavijo še nevropsihiatrični simptomi, ki se kažejo kot motnje čustvovanja in razpoloženja (depresija je pogosta, dokler imajo uvid v lastno stanje), psihoze (20 % jih ima vidne halucinacije), spremembe osebnosti in motnje vedenja (npr. socialno nesprejemljivo vedenje, verbalno in fizično nasilje). Vidna agnozija vključuje tudi nesposobnost prepoznave lastnega obraza in obrazov bližnjih. Bolnik postopoma izgubi sposobnost govora in drugih veščin in je v zadnjem stadiju bolezni povsem neobgleden ter v celoti odvisen od pomoči drugih. Od prvih kliničnih znakov AB do smrti mine v povprečju 8 – 10 let (25, 26).

5 DIAGNOSTIČNI POSTOPKI

Trenutno ni specifične laboratorijske preiskave, ki bi potrdila AB, zato diagnoza še vedno temelji na prepoznavanju kliničnih znakov bolezni. Najpogostejše uporabljani kriteriji za postavitev diagnoze Alzheimerjeve demence so (bili) DSM-IV (*angl. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) in kriteriji, ki jih leta 1984 izdal NINCDS-ADRDA (*angl. National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*). Na podlagi zadnjih je bilo moč opredeliti bolezen kot *možno*, *verjetno* in *zanesljivo*, pri čemer je bila diagnoza *zanesljiva* AB postavljena le pri bolnikih z *verjetno* AB, pri katerih so bile hkrati potrjene tudi patološke spremembe v možganih (z biopsijo ali avtopsijo) (27, 28). Kriteriji so bili zadovoljivo zanesljivi za diagnosticiranje *verjetne* AB, z ocenjeno diagnostično občutljivostjo ~80 % in specifičnostjo ~70 %. Zaradi novih spoznanj o bolezni se je v zadnjih desetletjih pojavila potreba po ponovnem pregledu in dopolnitvi obstoječih kriterijev (28, 29). Spomladi 2011 so bile tako objavljene nove diagnostične smernice, ki poleg vpeljave bioloških označevalcev prepoznajo tudi tri in ne le eno fazo bolezni – predklinično fazo brez simptomov, fazo z blagimi kognitivnimi motnjami, ki bolnika ne ovirajo pri dnevnih aktivnostih ter fazo razvite demence (29).

5. 1 DIAGNOZA DEMENCE (NE GLEDE NA VZROK)

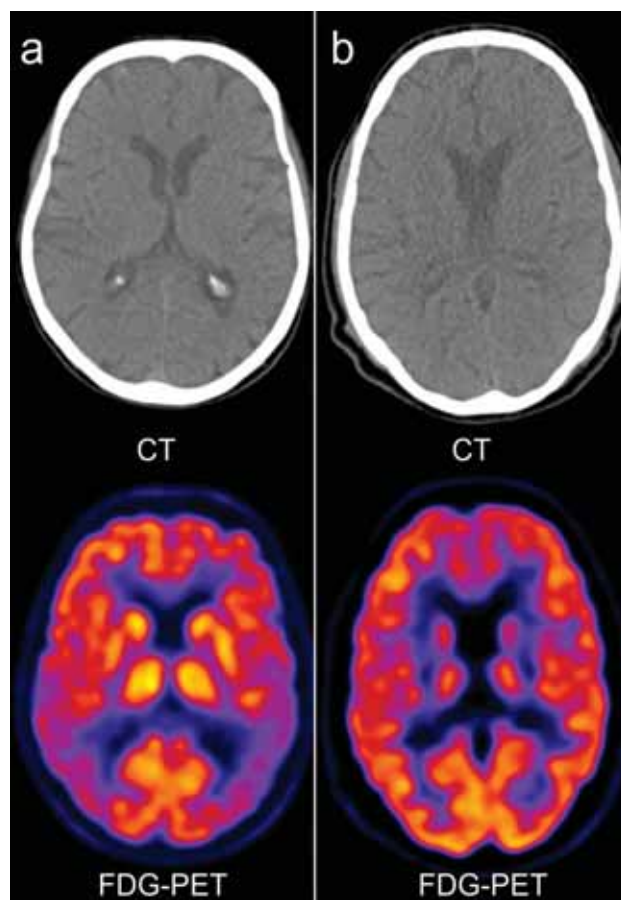
O demenci govorimo šele kadar kognitivni ali vedenjski simptomi pri bolniku napredujejo do te mere, da ga ovirajo pri vsakodnevni opravi. Odražajo jasen odklon od prejšnje stopnje funkcioniranja in jih ni moče razložiti z drugimi psihiatričnimi, nevrološkimi ali sistemskimi boleznimi. Kognitivni upad se oceni na podlagi pogovora in objektivne ocene, pridobljene s kratkim pregledom umskih sposobnosti ali daljšim nevropsihološkim testiranjem (27, 29). Kognitivna ali vedenjska motnja se kaže vsaj v dveh od sledečih domen: i) nesposobnost za priklic in pomnjenje novih informacij, ii) oteženo izvajanje zahtevnih opravil zaradi zmanjšane sposobnosti sklepanja in razsodnosti, iii) motnje vidno-prostorskih zaznav, iv) motnje govora, v) spremembe osebnosti oz. vedenja (29).

5.2 DIFERENCIALNA DIAGNOZA DEMENC

Najpogostejše oblike demence, ki predstavljajo približno 90 % vseh primerov demenc, so Alzheimerjeva demenca, demenca z Lewyjevim telescem, mešana demenca, vaskularna demenca ter fronto-temporalne demence. Celotna diferencialna diagnoza demenc je sicer precej obsežnejša in poleg primarno degenerativnih bolezni vključuje še sekundarne etiologije. V stopenjski obravnavi bolnika so zato pomembne tudi laboratorijske in slikovne preiskave, na podlagi katerih lahko izključimo najpogostejše ozdravljive oz. reverzibilne vzroke demenc, kot so na primer depresija, neželeni učinki zdravil, metabolne in nutriceijske motnje, pa tudi možganski tumorji, subduralni hematomi, hidrocefalus in nekatere infekcije. Rutinsko se priporočajo predvsem osnovne krvne preiskave, preiskave za ugotavljanje ščitnične funkcije ter določanje serumske vrednosti vitamina B₁₂ in folne kisline. Druge potencialno uporabne preiskave so npr. hitrost sedimentacije eritrocitov, urinska analiza, serologija sifilisa in borelioze ter elektroencefalografija (EEG) (27, 30).

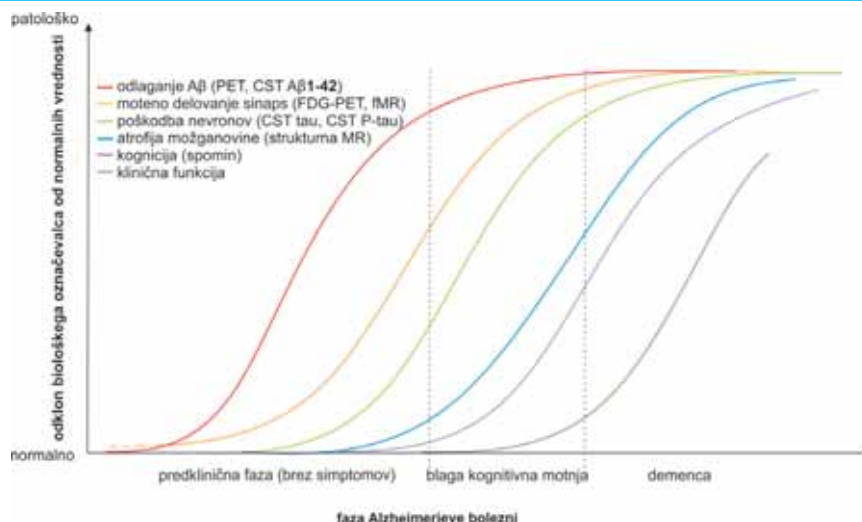
5.3 BIOLOŠKIH OZNAČEVALCI ALZHEIMERJEVE BOLEZNI

V širokem pomenu besede so biološki označevalci vsi fiziološki, biokemični in anatomske parametri, ki jih lahko merimo *in vivo* in ki odražajo značilnosti z boleznijo povezanega patofiziološkega procesa. Čeprav diagnostika AB še vedno sloni na vrednotenju klinične slike in izključevanju drugih vzrokov demence, se v diagnostično obravnavo vse bolj



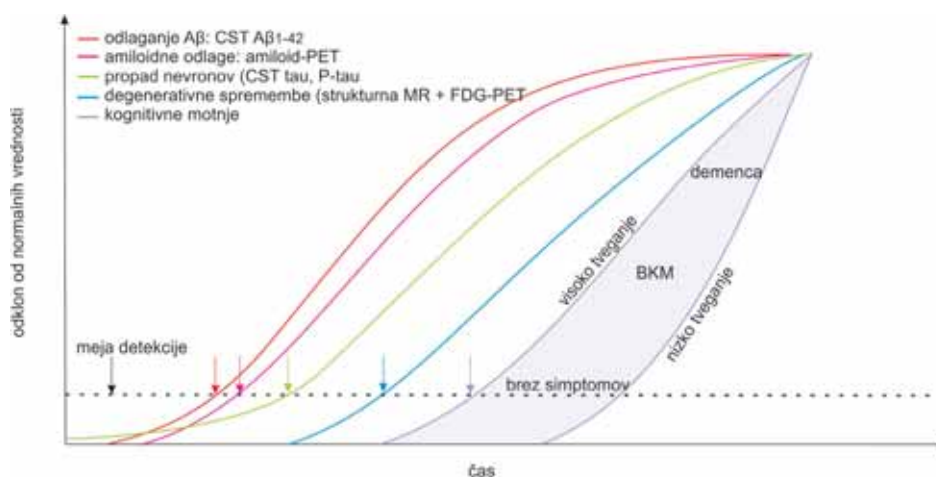
Slika 3: FDG-PET-CT pri bolniku z Alzheimerjevo boleznijo (a) in neprizadeti kontroli (b). Čeprav MR omogoča detailnejši prikaz sprememb mehkih tkiv, tudi s CT opazimo posledico nevrodegenerativnega procesa pri bolniku - atrofija parietotemporalno (a). PET s fluorodeoksiglukozo (FDG) kot kontrastnim sredstvom omogoča merjenje možganske metabolne aktivnosti. Za bolnike z Alzheimerjevo boleznijo je značilna zmanjšana metabolna funkcija (zmanjšan privzem FDG) v temporalnem in parietalnem režnju. Slike je prijazno posredoval dr. M. Grmek, Klinika za nuklearno medicino, UKC Ljubljana. MR – magnetnoresonančno slikanje, CT – računalniška tomografija, PET – pozitronska emisijska tomografija.

Figure 3: FDG-PET-CT in patient with Alzheimer's disease (a) and unaffected individual (b). Although MRI provides much more detailed soft tissue images the result of degeneration in a patient with Alzheimer's disease can be seen on CT scan as well parietotemporal atrophy (a). FDG implemented PET allows for examinations of metabolic brain function. Patients with Alzheimer's disease show evidence of decrease in metabolic activity, particularly in the temporoparietal regions. Images were kindly provided by M. Grmek, Department of Nuclear Medicine, University Medical Centre Ljubljana.



Slika 4a: Model dinamike bioloških označevalcev Alzheimerjeve bolezni. Na vertikalni osi je relativni dinamični razpon od normalnih vrednosti pri zdravi populaciji do maksimalno odklonilnih vrednosti pri bolnikih z Alzheimerjevo demenco. A β – amiloid β , PET – pozitronska emisijska tomografija, FDG – fluoro deoksiglukoza, CST – cerebrospinalna tekočina, P-tau – fosfo-tau, fMR – funkcionalna magnetna resonanca (po 32).

Figure 4a: Model of dynamics of biomarkers of Alzheimer's disease. Each biomarker is scaled in relation to its own full dynamic range from values recorded in completely unaffected individuals to maximally abnormal values in patients with end-stage dementia. Progressive clinical disease stage is on the horizontal axis (after 32).



Slika 4b: Posodobljen model dinamike bioloških označevalcev Alzheimerjeve bolezni in njihovi odkloni od normalnih vrednosti v odvisnosti od časa. Kognitivne motnje so označene kot območje, omejeno s krivuljami, ki ponazarjata posameznike z visokim oziroma nizkim tveganjem za razvoj demence. Meja detekcije patofizioloških odklonov je ponazorjena s prekinjeno črto. Upoštevano je, da se patologija beljakovine tau lahko pojavi pred odlaganjem A β , a pod mejo zaznave. Vrednosti A β 42 v likvorju se znižajo nekoliko prej, kot je opazna povečana retencija amiloidnega označevalca na PET. Sigmoidne krivulje nimajo več enakih oblik in so narisane bližje ena drugi, kar nakazuje manj izrazito časovno ločenost med njimi (32).

Figure 4b: Revised model of dynamics of biomarkers of Alzheimer's disease pathological cascade. Cognitive impairment is illustrated as a zone with low-risk and high-risk borders. The threshold for biomarker detection of pathophysiological changes is denoted by the black dotted line. The horizontal axis in updated model is expressed as time. Tau pathology precedes A β deposition in time, but only early on at a subthreshold detection level. A β deposition then occurs independently and rises above the biomarker detection threshold. CSF A β 42 is positioned slightly before amyloid PET and sigmoid curves are no longer identical – they are drawn closer together indicating less distinct temporal separation (32).

vpeljujejo tudi preiskave, ki omogočajo prikaz za bolezen značilnih sprememb (27, 28). Nove smernice zato predlagajo kriterije za razvrstitev demence zaradi AB v tri kategorije: i) *verjetna demenca AB*, ii) *možna demenca AB* in iii) *verjetna ali možna demenca AB z dokazi značilnega patofiziološkega procesa* (28). Med biološkimi označevalci, ki odražajo za AB značilen patofiziološki proces, ločijo kazalce kopičenja A β v možganih in kazalce degeneracije oz. poškodbe nevronov. Zaenkrat diagnostični kriteriji formalno vključujejo le pet najširše proučevanih bioloških označevalcev. V prvi skupini sta na pozitronski emisijski tomografiji (PET) opazna povečana retencija označevalca, ki se veže na A β ter znižana koncentracija A β 42 v cerebrospinalni tekočini (CST), medtem ko degenerativne spremembe v možganih odražajo zvišana koncentracija proteina tau in fosfo-tau v CST, s PET zaznan zmanjšan privzem ^{18}F -deoksiglukoze v temporalnem in parietalnem režnju (slika 3) ter značilen vzorec atrofije možganovine pri strukturnem magnetnoresonančnem slikanju (28).

V smernicah je opisan tudi model spreminjanja teh bioloških označevalcev s časom in v posameznih fazah bolezni – t. i. model dinamičnih bioloških označevalcev, ki se naslanja na predvideno zaporedje patofizioloških dogodkov, kakršnega predvideva prevladujoča hipoteza o amiloidni kaskadi (31). Kazalca odlaganja A β v možganih naj bi tako postala deviantna pred vsemi ostalimi in to že zelo zgodaj, ko posamezniki še niso kognitivno prizadeti (lahko celo 20 let pred pojavom značilnih simptomov). Kazalci neurodegeneracije postanejo očitno dinamični šele kasneje, ko se poveča nastajanje neurofibrilarnih pentelj, pojavi moteno delovanje sinaps in izguba nevronov (slika 4a). Zato tudi boljše korelirajo s kognitivnimi simptomi in napredovanjem bolezni (31). Zaradi novih izsledkov o spreminjanju nekaterih bioloških kazalcev s časom in spoznanj, da se lahko patologiji A β in proteina tau pri sporadični obliki AB pričneta neodvisno, so originalni model nekoliko posodobili. Po novem upošteva tudi velike medosebne razlike v časovnem zamiku med pojavom kazalcev patofiziološkega procesa in kognitivno motnjo, ki jih lahko pojasnimo predvsem s posameznikovo kognitivno rezervo, spremljajočimi boleznimi in prisotnostjo znanih dejavnikov tveganja (slika 4b) (32).

Prisotnost omenjenih bioloških označevalcev lahko pri ljudeh, ki izpolnjujejo klinične kriterije za *verjetno AB*, poveča zanesljivost, da je sindrom demence dejansko posledica AB. Ker pa niso v celoti standardizirani in validirani, smernice še ne priporočajo njihove uporabe v rutinski diagnostiki. Trenutno se zato uporabljajo zlasti v raziskovalne namene in le kot pomoč v klinični praksi (28).

Med genetskimi biološkimi označevalci smernice upoštevajo le mutacije v genih *APP*, *PSEN1* in *PSEN2*, medtem ko genetski dejavnik tveganja *ApoE4* zaradi nezadostne specifičnosti (ni ne zadosten ne potreben dejavnik za razvoj AB) ni vključen v diagnostične kriterije (28). Genetsko testiranje je zato uporabno le v diagnostiki AB z nastopom v zgodnji življenjski dobi, kjer so prednosti zgodnje postavitve diagnoze predvsem možna upočasnitev napredovanja bolezni, možnost posameznika za sprejemanje različnih življenjskih odločitev, (vezanih na določeno razvojno obdobje), pa tudi bolj varno funkcioniranje v vsakdanjem življenju (nadzor svojcev, strokovnjakov). V primerih sporadične AB ima genetsko testiranje le majhno klinično uporabnost, saj možnosti preventive in kurative zaenkrat niso poznane (33).

6 SKLEP

Celični in živalski modeli so pomembno pripomogli k podrobnejšemu razumevanju mehanizmov neurodegeneracije in proučevanju patogeneze AB. Prevladujoča predpostavka, da ima A β osrednjo vlogo v nastanku in razvoju bolezni, je poenostavila pojmovanje AB in olajšala razvoj spojin s potencialnim vplivom na njen potek. Vendar ta redukcionistični pristop v raziskovanju AB (še) ni prinesel želenih rezultatov. Kljub temu, da imamo sedaj spojine, ki *in vitro* preprečujejo nastajanje A β 42 in pri živalih odpravljajo patologijo A β ter celo spominske motnje, nima nobena od njih pričakovane učinkovitosti v kliničnih študijah. Zdravila, ki bi pozdravilo AB, ni. Z vključevanjem bioloških označevalcev AB bo možno izboljšati načrtovanje kliničnih raziskav, saj lahko služijo ne le kot orodje za izbor primerne tarčne populacije (zgodnja faza bolezni z dokazi patofiziološkega procesa), temveč tudi kot nadomestni kazalci učinkovitosti. Po drugi strani se bo morda potrebno bolje zavedati kompleksnosti naravnega sistema in se osredotočiti na več tarčnih mehanizmov hkrati. Ločeno obravnavanje neurodegenerativnih, vnetnih in žilnih obolenj vodi namreč v postavljanje enostavnih hipotez, ki jih v klinični praksi ne (ali le redko) uspemo potrditi. Tako smo še vedno na stopnji iskanja alternativnih (enostavnih) hipotez o vzrokih nastanka, in to v času, ko nujno potrebujemo zdravila, da bi se uspešno soočili z naraščajočim socialnim in ekonomskim bremenom te bolezni.

7 LITERATURA

1. Karantzoulis S, Galvin JE. Distinguishing Alzheimer's disease from other major forms of dementia. *Expert Rev Neurother* 2011; 11(11): 1579–1591.
2. Ubhi K, Masliah E. Alzheimer's disease: recent advances and future perspectives. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* 2013;33 Suppl 1:S185–94.
3. Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, et al. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology* 2011;21(10):718–79.
4. Di Luca M, Baker M, Corradetti R et al. Consensus document on European brain research. *European Journal of Neuroscience* 2011;33:768–818.
5. World Health Organization. The top 10 causes of death. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index4.html>. Dostop: 23. 6. 2013
6. Alzheimer A. Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt* 1906; 23: 1129–36.
7. Fjell AM, Walhovd KB. Neuroimaging results impose new views on Alzheimer's disease—the role of amyloid revised. *Molecular Neurobiology* 2012;45:153–72.
8. Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:321–39
9. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012;2:a006270.
10. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2007;8:499–509.
11. Braak H, Del Tredici K. Evolutional aspects of Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 2013;33 Suppl 1:S155–61.
12. Bresjanac M, Bunc M, Črne-Finderle N, Grubič Z, Kamrič L, Kordaš M, Pavlin R, Ribarič S, Sket D, Sketelj J, Šuput D, Zorec R, Živin M. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta. Ljubljana 2001.
13. Pimplikar SW. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009;41:1261–8.
14. Popović M, Gazić B. Proteinopatije – bolezni odlaganja napačno zvutih beljakovin. *Med Razgl* 2008;47:391–402.
15. Mullane K, Williams M. Alzheimer's therapeutics: continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis—but what lies beyond? *Biochemical Pharmacology* 2013;85:289–305.
16. Reitz C. Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012;2012:doi:10.1155/2012/369808.
17. Haass C. Initiation and propagation of neurodegeneration. *Nature Medicine* 2010;16:1201–4.
18. Kaye R, Lasagna-Reeves CA. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* 2013;33 Suppl 1:S67–78.
19. Dong S, Duan Y, Hu Y, Zhao Z. Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. *Translational Neurodegeneration* 2012;1:18.
20. Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 2011;10:698–712.
21. Blennow K. Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. *Nature Medicine* 2010;16:1218–22.
22. Herrup K. Reimagining Alzheimer's disease—an age-based hypothesis. *The Journal of Neuroscience* 2010;30:16755–62.
23. Moreira PI. Alzheimer's disease and diabetes: an integrative view of the role of mitochondria, oxidative stress, and insulin. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* 2012;30 Suppl 2:S199–215.
24. Hickman SE, El Khoury J. The neuroimmune system in Alzheimer's disease: the glass is half full. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* 2013;33 Suppl 1:S295–302.
25. Alzheimer's Society. The progression of Alzheimer's disease and other dementias. http://www.alzheimers.org.uk/site/scripts/documents_info.php?documentID=133. Dostop: 29. 6. 2013
26. Förstl H, Kurz A. Clinical features of Alzheimer's disease. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 1999;249:288–90.
27. Yaari R, Corey-Bloom J. Alzheimer's disease. *Semin Neurol* 2007;27(1):32–41.
28. Jack CR, Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling R a, Carrillo MC, et al. Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 2011;7:257–62.
29. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 2011;7:263–9.
30. Alzheimer's Association. Diagnosing Alzheimer's. http://www.alz.org/professionals_and_researchers_diagnostic_procedures.asp. Dostop: 1. 7. 2013
31. Sperling R a, Aisen PS, Beckett L a, Bennett D a, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 2011;7:280–92.
32. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurology* 2013;12:207–16.
33. Atkins ER, Panegyres PK. The clinical utility of gene testing for Alzheimer's disease. *Neurology International* 2011;3:e1.